

# Neue Miniproteininhibitoren gegen die humane Typ II Transmembranserinprotease Matriptase (MT-SP1)



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte  
Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Michael Tomaszowski  
aus Langen

Referent:  
Korreferent:  
Tag der Einreichung  
Tag der mündlichen Prüfung

Prof. Dr. H. Kolmar  
Prof. Dr. K. Schmitz  
03. September 2012  
29. Oktober 2012

Darmstadt 2013

D 17

---

„An sich ist nichts weder gut noch böse. Erst das Denken macht es dazu.“

Hamlet, William Shakespeare

---

---

## Inhaltsverzeichnis

---

Inhaltsverzeichnis	i
1.....Einleitung	1
1.1. Transmembranserineproteasen	4
1.1.1. Matriptase (MT-SP1)	7
1.2. Cystinknoten-Miniproteine	10
1.2.1. MCoTI-II	11
1.3. Protein Engineering	12
1.3.1. Rationales Protein Design	12
1.3.2. Gerichtete Evolution	13
1.4. Yeast Surface Display	15
1.5. Zielsetzung	16
2.....Material	17
2.1. Bakterien und Hefestämme	17
2.2. Plasmide	17
2.2.1. pET42dest His-Matriptase 596_855	17
2.2.2. pCT EGFR	18
2.2.3. pCT ocMCoTI-II	19
2.3. DNA Längenstandards und Protein-Molekulargewichtsmarker	20
2.3.1. DNA Längenstandards für Agarosegelelektrophorese	20
2.3.2. Molekulargewichtsmarker für Proteinelektrophorese	20
2.4. Oligodesoxyribonukleotide	21
2.5. Antikörper, Enzyme, Proteine und Nukleinsäuren	22
2.6. Chemikalien	22
2.7. Sonstige Materialien und Geräte	25
2.8. Nährmedien	28
2.9. Lösungen und Puffer	29
2.10. Kits	33
3.....Methoden	34
3.1. Mikrobiologische Methoden	34
3.1.1. Vorbereiten von Geräten und Lösungen	34
3.1.2. Stammhaltung und Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	34
3.1.3. Stammhaltung und Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
3.1.4. Bestimmung der Zelldichte	34
3.1.5. Transformation von <i>Escherichia coli</i>	35
3.1.6. Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
3.1.7. Expression von MT-SP1 in <i>Escherichia coli</i>	36
3.1.8. Oberflächenpräsentation von Miniproteinen auf <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
3.2. Molekularbiologische Methoden	37
3.2.1. Fällung von DNA mit Ammoniumacetat und Ethanol	37
3.2.2. Agarosegelelektrophorese	37

---

3.2.3.	Bestimmung der DNA Konzentration	37
3.2.4.	Extraktion von DNA aus Agarosegelen und PCR Ansätzen mittels Wizard® SV Gel und PCR Clean-Up System Kit (Promega)	38
3.2.5.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	38
3.2.5.1.	Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Mini-Präparation) mit dem Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System-Kit (Promega)	38
3.2.5.2.	Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen (Midi-Präparation) mit dem Pure Yield® Plasmid Midiprep System-Kit (Promega)	38
3.2.6.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
3.3.	Enzymatische Manipulation von DNA	39
3.3.1.	Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	39
3.3.2.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
3.3.3.	Kolonie PCR von <i>Escherichia coli</i>	40
3.3.4.	Kolonie PCR von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
3.4.	Proteinchemische Methoden	41
3.4.1.	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
3.4.2.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	42
3.4.3.	Lagerung von Proteinen	42
3.4.4.	Zellaufschluss von <i>Escherichia coli</i>	42
3.4.5.	Chromatographische Aufreinigung von Proteinen	43
3.4.5.1.	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)	43
3.4.5.2.	Ionenaustauschchromatographie	43
3.4.5.3.	Affinitätschromatographie mit Benzamidinsepharose	44
3.4.6.	Dialyse	44
3.4.7.	<i>Reversed Phase High Performance Liquid Chromatographie</i> (RP-HPLC)	45
3.4.8.	Rückfaltung von Miniproteinen	45
3.4.9.	Lyophilisation	45
3.4.10.	Massenspektrometrische Analyse von Proteinen	46
3.4.11.	Biotinylierung von Proteinen	46
3.4.12.	Extraktionen von Miniproteinen aus Samen von <i>Momordica cochinchinensis</i>	47
3.5.	Enzymkinetische Methoden	47
3.5.1.	Active-Site Bestimmung Serinproteasen	47
3.5.1.1.	Active-Site Bestimmung von Trypsin	47
3.5.1.2.	Active-Site Bestimmung von Matritase I	48
3.5.2.	Bestimmung der apparenten Inhibitionskonstante gegen Trypsin	48
3.5.3.	Bestimmung der apparenten Inhibitionskonstante gegen Matritase	49
3.5.4.	Bestimmung der Inhibitorkonzentration für hochaffine Trypsinbinder	49
3.6.	Zellbiologische Methoden	49
3.6.1.	Immunofluoreszenzmarkierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
3.6.2.	Durchflusszytometrie von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
3.6.3.	Magnetische Sortierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
3.7.	Mikrowellen gestützte Festphasensynthese von Proteinen	51
3.7.1.	Manuelle Synthese von Proteinen am Discover SPS	51

---

---

3.7.1.1.	Handhabung der Festphase	51
3.7.1.2.	Kopplungszyklus	51
3.7.1.3.	Kaisertest	53
3.7.1.4.	Abspaltung und postsynthetisches Work-up	53
3.7.2.	Automatische Synthese von Proteinen am Liberty™	53
4.....	Ergebnisse und Diskussion	56
4.1.	Isolierung verschiedener MCoTI Varianten aus <i>Momordica cochinchinensis</i>	56
4.2.	Isolierung von Matriptase (MT-SP1) aus <i>E.coli</i>	57
4.2.1.	Bestimmung der aktiven Matriptasekonzentration	58
4.2.2.	Aufreinigung über Ionenaustausch- oder Affinitätschromatographie	59
4.3.	Bestimmung apparenter $K_i$ 's isolierter MCoTI-II Varianten gegenüber MT-SP1	61
4.3.1.	Bestimmung der exakten Miniproteinkonzentration	61
4.3.2.	Matriptase (MT-SP1) Inhibition	62
4.4.	Diskussion I	63
4.5.	Rationales Protein Design verschiedener MCoTI-II Varianten	65
4.6.	Chemische Synthese designer MCoTI-II Varianten	68
4.6.1.	oMCoTI-II	68
4.6.2.	oMCoTI-N1	69
4.6.3.	oMCoTI-Y1	69
4.6.4.	oMCoTI-W2	70
4.6.5.	oMCoTI-R5	70
4.6.6.	oMCoTI-Q9	70
4.6.7.	oMCoTI-S11	71
4.6.8.	oMCoTI-S12	71
4.6.9.	oMCoTI-E15	72
4.6.10.	oMCoTI-S11/S12	72
4.6.11.	oMCoTI-R5/D6/R8	72
4.7.	Bestimmung apparenter $K_i$ 's rational designer MCoTI-II Varianten gegenüber MT-SP1	73
4.8.	Diskussion II	74
4.9.	Erstellung kombinatorischer oMCoTI-II Bibliotheken	75
4.9.1.	MCoTI Bibliothek I	75
4.9.2.	MCoTI Bibliothek II	77
4.10.	Durchmusterung von oMCoTI-II Bibliotheken mittels <i>Yeast Surface Display</i>	79
4.10.1.	MACS Vorselektion der Bibliotheken	81
4.10.2.	FACS Durchmusterung der MCoTI Bibliothek I	82
4.10.3.	FACS Durchmusterung der MCoTI Bibliothek II	84
4.10.4.	Analyse selektierter MCoTI Varianten	86
4.11.	Chemische Synthese gefundener MCoTI-II Varianten	90
4.11.1.	MC Clone1	90
4.11.2.	MC Clone2	90
4.11.3.	MC Clone3	91
4.11.4.	MC Clone4	91
4.12.	Bestimmung apparenter $K_i$ 's gefundener MCoTI-II Varianten gegenüber MT-SP1	92

---

---

4.13.	Bestimmung der Proteasespezifität	94
4.14.	Diskussion III	95
5.....	Zusammenfassung und Ausblick	99
	Literaturverzeichnis	100
	Abkürzungsverzeichnis	107
	Abbildungen	110
	Wissenschaftliche Veröffentlichungen und Präsentationen	110
	Danksagung	111
	Erklärung	112
	Lebenslauf	114

## 1. Einleitung

Die Hydrolyse von Peptidbindungen spielt eine wichtige Rolle in biologischen Systemen. Diese Aufgabe wird von proteolytischen Enzymen, den Proteasen durchgeführt. Es gibt über 600 verschiedene Proteasen, sie machen in etwa zwei Prozent des menschlichen Genoms aus und stellen damit die größte Gruppe an Enzymen.<sup>[1, 2]</sup> Proteolytische Enzyme lassen sich in verschiedene Klassen aufgrund ihrer unterschiedlichen katalytischen Mechanismen für die Substrathydrolyse unterteilen, die Serinproteasen, zu denen Trypsin und Thrombin zählen, Cysteinproteasen mit Papain als Vertreter, Threonylproteasen die im Proteasom vorkommen, Aspartylproteasen zu denen Pepsin gehört und die Matrix-Metalloproteasen (MMPs) oder Carboxypeptidase A.<sup>[3, 4]</sup> Die ursprüngliche Funktion der Proteasen wurde lange nur dem Proteinabbau bei der Verdauung und dem intrazellulären Proteinumsatz zugeordnet. Heutzutage weiß man, dass sie bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen wie zum Beispiel der Hämostase, der Wundheilung, der Angiogenese und Apoptose, sowie Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle spielen.<sup>[5, 6]</sup>

Eine der größten und zugleich streng konservierten Klasse unter den Proteasen stellen die Serinproteasen dar.<sup>[7, 8]</sup> Das aktive Zentrum bildet die katalytische Triade bei dieser Gruppe [Abb. 1.1]. Sie besteht aus einem Histidin, einem Aspartat und einem Serin, die über Wasserstoffbrücken verbunden sind. Der Mechanismus umfasst einen nucleophilen Angriff des Serin an die Carbonylgruppe der zu spaltenden Peptidbindung, dabei entsteht ein tetraedischer Übergangszustand. Per Säurekatalyse durch das vom Aspartat polarisierte Histidin wird das Acyl-Enzym Zwischenprodukt gebildet. Anschließend erfolgt der Abgang der Animogruppe und ein Wassermolekül tritt an seine Stelle. Danach läuft die Katalyse quasi rückwärts ab, um das Carboxylprodukt und das aktive Enzym zurückzugewinnen.<sup>[9]</sup> Es gibt mehrere Subtypen dieses Reaktionsmechanismus, die sich in der Position der Aminosäuren unterscheiden. Die bekanntesten Subtypen besitzen das Chymotrypsin Faltungsmotiv (S1), mit Ser<sup>195</sup>, Asp<sup>102</sup> und His<sup>57</sup>. Dazu gehören Chymotrypsin und Trypsin.<sup>[10]</sup>

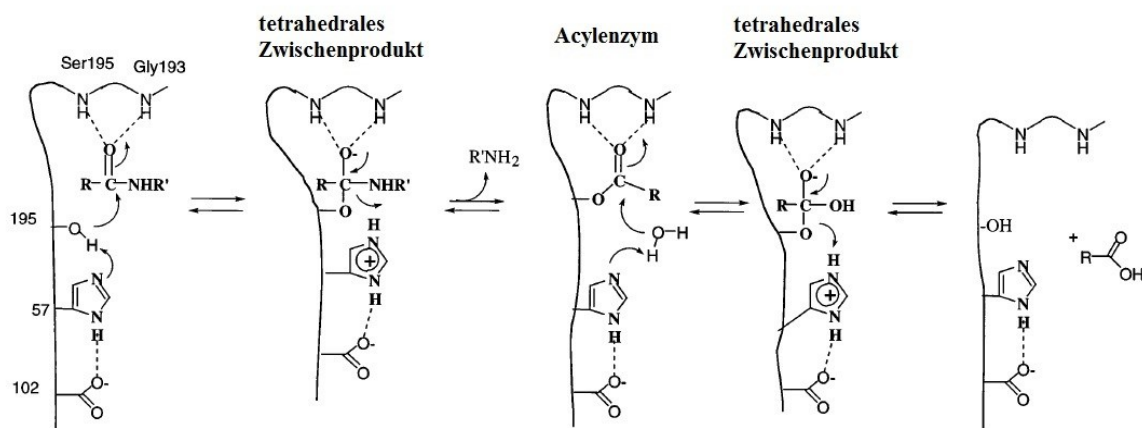


Abbildung 1.1 Mechanismus der Peptidhydrolyse von Serinproteasen. Modifiziert nach <sup>[11]</sup>

Die Substratspezifität der Serinproteasen umfasst mehrere Bindungsstellen, die sich nach der Nomenklatur von Schechter und Berger in die *substrate recognition site* und *polypeptide binding site* unterteilen lassen.<sup>[12]</sup>

Die Peptidreste P1-Pn des zu spaltenden Proteins befinden sich auf der N-terminalen Acylseite und die P1'-Pn' Reste in der C-terminalen Abgangsgruppe. Analog dazu sind die Substratbindungsstellen in der Protease mit S1-Sn und S1'-Sn' benannt [Abb. 1.2B]. Die Spezifität der Chymotrypsin-ähnlichen Proteasen lässt sich anhand der S1-P1 Wechselwirkung charakterisieren.<sup>[13]</sup> So bildet die *S1-site* bei Chymotrypsin eine tiefe hydrophobe Tasche aus, die Aminosäuren wie Phenylalanin an der *P1-site* bevorzugt.<sup>[14]</sup> Elastase besitzt eine kleine *S1-Site* und bevorzugt deswegen aliphatische Aminosäuren wie Alanin.<sup>[15]</sup> Bei Trypsin werden die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin bevorzugt, da hier die *S1-site* durch Aspartat<sup>189</sup> eine negative Ladung erhält.<sup>[16]</sup> Die Wechselwirkungen des Substrates mit den *S2-Sn sites* sind für die weitere Spezifität der zu hydrolysierenden Peptide verantwortlich. Ebenso gilt dies für *S1'-Sn' sites*, die aber meistens nicht bekannt sind, da hier die Abgangsgruppe gebunden wird.<sup>[17]</sup> Für eine Hydrolyse der Peptide ist ebenso die Ausbildung einer anti-parallelen  $\beta$ -Faltblattstruktur mit den Peptidresten P1-P3 des Substrates notwendig.<sup>[18]</sup>

Die Aktivierung der Proteasen unterscheidet sich von anderen Signalwegen dahingehend, dass sie irreversibel ist und deshalb einer strengen Regulierung durch Inhibitoren und Expression als Zymogenen unterliegt [Abb. 1.2A].<sup>[19, 20]</sup> Die Zymogene besitzen eine zusätzliche Peptidsequenz die zu einer Deformation des aktiven Zentrums führt. Erst durch proteolytische Prozessierung dieser Sequenz wird ein Konformationswechsel induziert und die Protease aktiviert.<sup>[11]</sup> Dieser Mechanismus kann wie z.B. bei Trypsin oder Chymotrypsin auch autokatalytisch erfolgen.<sup>[21]</sup> Erfolgt die Aktivierung nicht autokatalytisch sondern über andere Enzyme spricht man von einer Kaskade. Als klassisches und gut untersuchtes Beispiel für diese Art der Proteolyse gilt die Blutgerinnungskaskade.<sup>[22]</sup>

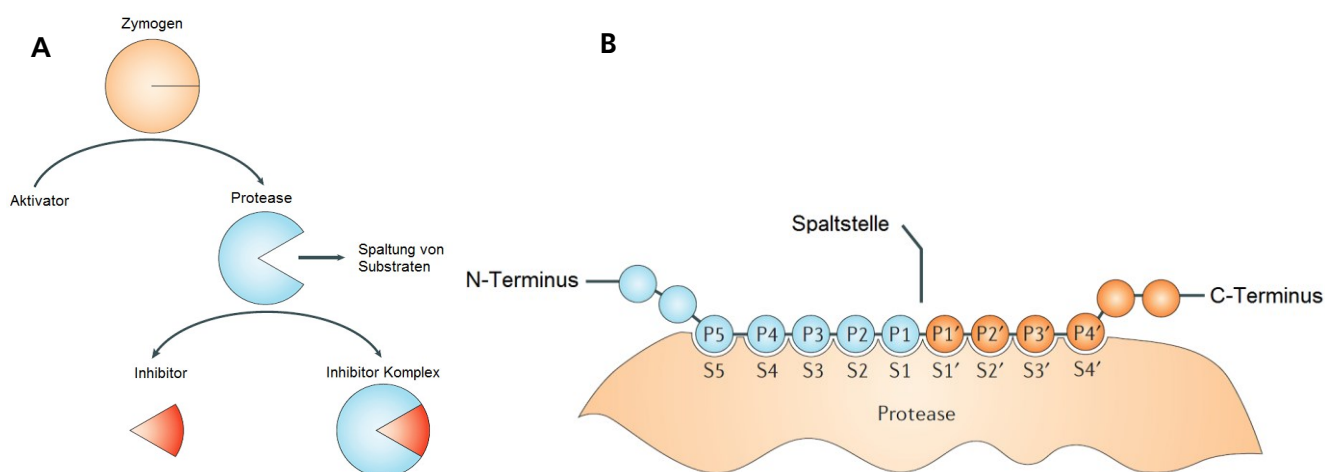


Abbildung 1.2 A) Allgemeines Funktionsprinzip von Proteasen. Zuerst liegen sie als Zymogen vor und werden durch einen allosterischen Aktivator oder andere Protease aktiviert. Einmal aktiviert ist dies irreversibel und die Hydrolyse der Substrate beginnt. Diese Reaktion steht in Konkurrenz mit vorhandenen Inhibitoren, deren Konzentration über andere Signale reguliert wird. B) Schema einer Substratbindung an eine Protease. Die Nomenklatur der einzelnen Bindungsstellen erfolgt nach Schechter und Berger. Die Struktur der einzelnen *S-sites* bestimmt die Substratspezifität einer Protease. Modifiziert nach <sup>[6]</sup>

Natürliche Inhibitoren nehmen eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Proteasen ein. Sie kommen oft in hohen Konzentrationen im Organismus vor und in der Regel handelt es sich dabei um Proteine, die sich anhand ihres Inhibitionsmechanismus unterscheiden lassen. Derzeit sind vier unterschiedliche Arten von Inhibitoren bekannt.<sup>[23]</sup>



Kanonische Inhibitoren binden in einer substratähnlichen Weise und bilden einen Michaelis Komplex, wie er z.B. bei den Serpinen vorkommt.<sup>[24]</sup> Exosite Inhibitoren blockieren die Substratbindungstasche, indem sie in benachbarten Regionen ebenfalls substratähnlich binden und damit den Zugang zu ihr blockieren. Zu dieser Gruppe gehören z.B. die Cystatine, die Cathepsine inhibieren.<sup>[25]</sup> Ebenfalls möglich ist eine Kombination aus den beiden vorhergenannten Inhibitionsarten, die als quasi substratähnlich bezeichnet wird und unter anderem bei den Inhibitoren von Metalloproteasen gefunden wird.<sup>[26]</sup> Die letzte Klasse der Inhibition stellen die allosterischen Inhibitoren dar, die im Gegensatz zu den anderen Arten nicht kompetitiv inhibieren sondern Konformationsänderungen erzeugen oder auch Dimerisierungen unterbinden.<sup>[27]</sup>

Durch die zentrale Rolle in vielen biologischen Prozessen führt eine Dysregulierung der Proteaseaktivität zu unterschiedlichen Krankheiten, wie zum Beispiel rheumatoider Arthritis, Hypertonie, Hämophilie aber auch zum Tumorwachstum und Metastasierung bei einigen Krebsarten.<sup>[28-33]</sup>

Die ersten bekannten Medikamente gegen Krankheiten bei den Proteasen beteiligt sind, wurden in den 1950iger Jahren eingesetzt. Die bekannteste Gruppe von Medikamenten stellen derzeit die ACE Inhibitoren (*angiotensin converting enzyme*) für die Behandlung von Bluthochdruck dar.<sup>[6]</sup> Während Proteasen der Gerinnungskaskade und inflammatorischer Prozesse schon lange Gegenstand der Forschung sind, hat in den letzten Jahren die Forschung an Proteasen, die an dem Wachstum und Metastasierung von Tumorzellen beteiligt sind mehr und mehr an Interesse gewonnen.<sup>[34]</sup> Eine besondere Rolle bei dem Fortschreiten von Krebs scheinen dabei die Typ II Transmembranserinproteasen darzustellen auf die im folgenden Abschnitt genauer eingegangen wird.

## 1.1. Transmembranserinproteasen

Die Transmembranserinproteasen wurden erst in den letzten Jahren als eine Unterklasse der Serinproteasen entdeckt. Sie sind mit einem Teil ihrer Struktur in der Plasmamembran verankert und ihre katalytische Domäne liegt extrazellulär vor. Im Gegensatz zu sekretierten Proteasen, die meistens katabolische Funktionen haben, wird den Transmembranserinproteasen eine zentrale Rolle in unterschiedlichen Signalkaskaden zugeschrieben.<sup>[35]</sup> Es gibt drei verschiedene Gruppen dieser Enzymklasse. Erstens sind die Typ I Transmembranserinproteasen Mitglieder dieser Klasse. Diese sind C-terminal in der Membran verankert.<sup>[36, 37]</sup> Zweitens gehören dazu, über einen GPI Anker mit der Membran verbundenen Proteasen, zu denen auch Prostasin<sup>[38, 39]</sup> und Testisin<sup>[40, 41]</sup> gezählt werden. Auf diese beiden ersten Klassen wird in dieser Arbeit nicht näher eingegangen. Drittens stellen die N-terminal in der Membran verankerten Proteasen, die sogenannten Typ II Transmembranserinproteasen (TTSP's) die größte Gruppe dar.<sup>[42]</sup> Die bekannteste Protease aus dieser Gruppe ist die Enteropeptidase, die bereits vor über hundert Jahren aufgrund ihrer Rolle in der Verdauung, der Aktivierung von Trypsinogen, entdeckt wurde.<sup>[43]</sup> Ihre Zuordnung zur Klasse der TTSP's erfolgte aber erst durch Arbeiten an Hepsin in den neunziger Jahren.<sup>[44-46]</sup> Aufgrund ihrer Sequenzhomologie lassen sich die Typ II Transmembranserinproteasen in weitere vier Unterfamilien aufteilen. Die Matriptase-Familie, die Corin-Familie, die Hepsin/TMPRSS-Familie und die HAT/DESC-Familie [Abb. 1.3]. Bis heute sind 20 verschiedene humane Proteine dieser Familien bekannt.<sup>[47]</sup> Alle TTSP's sind als Multidomänenproteine aufgebaut. Sie bestehen aus einer cytoplasmischen Domäne, einer kurzen Transmembrandomäne, einer stark variablen Stammregion und der konservierten katalytischen Domäne am C-Terminus. Über die Funktion der cytoplasmischen Domäne weiß man nur wenig, so ist nicht bekannt ob eine Interaktion mit Cytoskelett oder Signalmolekülen stattfindet. Einige TTSP's weisen aber Konsensussequenzen für Phosphorylierungsstellen auf.<sup>[35]</sup> Die Stammregion besteht aus sieben verschiedenen Strukturmotiven, die in jeder Protease unterschiedlich zusammengesetzt und vorhanden sind. Das häufigste Strukturmotiv ist die LDL Rezeptor Klasse A (LDLRa) Domäne. Ihre Funktion bei den TTSP's ist unbekannt. Bei anderen Proteinen bindet die LDLRa Domäne allerdings  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und ist für die Internalisierung von Makromolekülen wie Protease/Inhibitor Komplexen sowie Lipoproteinen verantwortlich.<sup>[48-50]</sup> Die *scavenger receptor* (SR) Domäne kommt in mehreren TTSP's vor und vermittelt die Bindung an polyanionische Moleküle, wie Lipoproteine, Zelloberflächenlipide oder sulfatierte Polysaccharide.<sup>[51]</sup> Die CUB (*Cls/Clr, urchin embryonic growth factor and bone morphogenic protein-1*) Domäne kommt in der Matriptase Unterfamilie und Enteropeptidase vor. Sie findet sich in einer Vielzahl von Proteine die für die Differenzierung von Zellen verantwortlich sind.<sup>[52]</sup> Die SEA (*sea urchin sperm protein, enterokinase, agrin*) Domäne verbindet sich o-glykosidisch mit Proteoglykanen in kohlenhydratreichen Umgebungen.<sup>[53]</sup> Die MAM (*meprin, A5 antigen, and receptor protein phosphatase*) Domäne ist homolog zur SEA Domäne ist und ihre Funktion wird auch der Adhäsion von Proteinen zugeordnet.<sup>[54]</sup> Die *Frizzled* Domäne kommt nur in Corin vor und funktioniert als Rezeptor für Wnt Proteine.<sup>[55]</sup> Die katalytische Domäne aller TTSP's weist das Chymotrypsin (S1) Faltungsmotiv auf, wird als einzelnes Zymogen synthetisiert und muss proteolytisch an einem Arginin oder Lysin aktiviert werden. Diese Spaltstelle befindet sich in einer konservierten Region vor der katalytischen Domäne. Nach ihrer Aktivierung verbleibt die katalytische Domäne über eine Disulfidbrücke kovalent mit dem Rest des Proteins und damit mit der Zelloberfläche verbunden.<sup>[42]</sup> Einige TTSP's besitzen die Möglichkeit sich durch Autokatalyse selbst zu aktivieren, dazu gehören Matriptase 2<sup>[56]</sup>, Hepsin<sup>[57]</sup> und auch MT-SP1.<sup>[58]</sup>

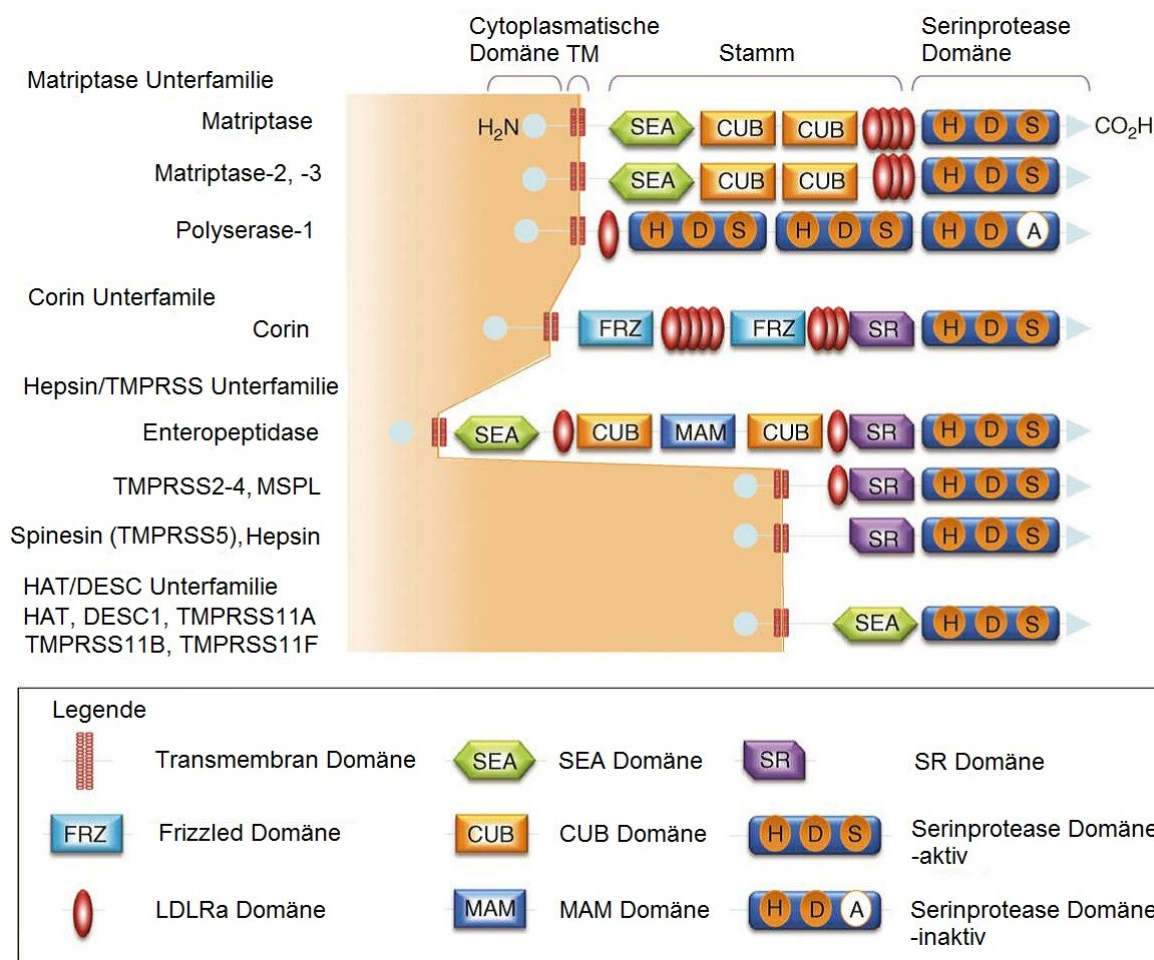


Abbildung 1.3 Multidomänenstruktur der humanen Typ II Transmembranserinproteasen. Die TTSP's lassen sich in ihre vier Unterfamilien, die Matriptase, Corin, Hepsin/TMPRSS und HAT/DESC Unterfamilie entsprechend der Sequenzhomologie aufteilen. Jede Protease besteht N-Terminal aus einem cytoplasmatischen Teil, einer Transmembrandomäne, der Stammregion und C-Terminal der katalytischen Domäne. Die Stammregion setzt sich aus unterschiedlichen Motiven wie der LDLRa, SR, SEA, MAM, CUB, Frizzled und bei Polyserase-1 auch aus katalytischen Domänen zusammen. Das A in Polyserase-1 steht für Alanin und stellt damit eine inaktive katalytische Domäne dar. Modifiziert nach <sup>[5]</sup>

Das Vorkommen der TTSP's ist unterschiedlich. Einige unterliegen nur in bestimmten Gewebearten einer hohen Expression, was auf eine spezialisierte Rolle schließen lässt. So kommen Matriptase-2 und Hepsin in großen Mengen nur in fötalem und adultem Lebergewebe vor.<sup>[45, 56]</sup> Corin findet man ausschließlich in Herzgewebe.<sup>[59, 60]</sup> Spinesin findet man im Gehirn<sup>[61]</sup> und HAT (*human airway trypsin like protease*) in den unteren Atemwegen und der Luftröhre.<sup>[62, 63]</sup> Andere findet man hingegen in vielen Gewebearten. So kommt z.B. DESC-1 (*differentially expressed in squamous cell carcinoma*) unter anderem im Darm, der Prostata, der Lunge, den Nieren und der Leber vor.<sup>[64]</sup>

Über die eigentliche physiologische Funktion der meisten Proteasen dieser Gruppe ist wenig bekannt und die Mehrzahl ihre Zielmoleküle sind ebenso noch nicht bekannt. Eine Ausnahme stellt z.B. die Enteropeptidase dar. So ist bekannt, dass eine physiologische Menge an Trypsin PAR-2 (*protease activated receptor 2*), einen G-Protein gekoppelten Rezeptor auf Enterozyten aktivieren kann. Durch Bindung von Trypsinogen und Aktivierung zu Trypsin durch die Enteropeptidase, die sich auf der Zellmembran befindet, kann der sich ebenfalls auf der Oberfläche befindliche PAR-2 aktiviert und damit die Signaltransduktionskaskade eingeleitet werden.<sup>[65-67]</sup>

Durch die Lokalisierung auf der Zelloberfläche werden einigen TTSP's Funktionen im Zellwachstum und Differenzierung zugeschrieben.<sup>[68, 69]</sup> Ähnlich wie andere membranassoziierte proteolytische Systeme den ADAM's (*a Disintegrin and Metalloproteinase*), MT-MMP's (*membrane type matrix*

*metalloproteases*) oder dem uPA/uPAR (*urokinase plasminogen activator receptor*) System können sie PAR's, Wachstumsfaktoren und Cytokine aktivieren und mit löslichen Liganden interagieren.<sup>[35, 42]</sup> Ebenso können sie als zentrale Komponenten in den anderen membranassoziierten Systemen integriert sein. Am Beispiel von MT-SP1 konnte bereits nachgewiesen werden, dass sie eine Funktion in der direkten und indirekten Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen besitzt.<sup>[70]</sup>

Weitaus mehr als über die physiologischen Funktionen der TTSP's ist darüber bekannt, was ihre Dysregulierungen auslösen können. So wird diese Klasse von Proteasen durch ihre vermutlichen zentralen Funktionen oft in Verbindung mit unterschiedlichen Krebsarten gebracht.<sup>[28-31, 33]</sup> Eine Überproduktion dieser Proteasen geht oft einher mit einer starken Tumorphilisation, Migration und invasivem Wachstum.<sup>[47]</sup> So stellt z.B. Hepsin das am stärksten hochregulierte Gen in Prostatakrebs dar und führt zur einer starken Entartung des Gewebes.<sup>[71]</sup> Die Überregulierung von TTSP's bei Krebs ist das am häufigsten beobachtete Phänomen wie in Tabelle 1.1 zu sehen ist. Eine Ausnahme stellt DESC1 dar, das bei Plattenepithelkarzinomen herunterreguliert ist.<sup>[72]</sup>

Die starke Differenzierung der Expression der TTSP's von Tumorgewebe zu normalen Gewebe und die ihnen zugeschriebenen Funktionen machen sie zu idealen Zielmolekülen für therapeutische und diagnostische Zwecke in der Medizin. Die interessanteste und bestuntersuchte Protease dieser Klasse stellt derzeit Matriptase dar. Auf sie wird im folgenden Abschnitt genauer eingegangen.

Tabelle 1.1 Liste der Tumore bei denen eine veränderte Expression der TTSP's vorliegt. Modifiziert nach Szabo et al.<sup>[47]</sup>

Protease	Krebs	Expressionsmuster
<b>DESC1</b>	Plattenepithelkarzinom	Reduzierte oder keine Expression
<b>TMPRSS2</b>	Prostatakrebs	Signifikant hochreguliert
<b>TMPRSS3</b>	Eierstockkrebs	Erhöhte Level einer inaktiven Splicevariante
<b>TMPRSS4</b>	Bauchspeicheldrüsenkrebs	Signifikante Überexpression
	Schilddrüsenkrebs	Hochreguliert in bösartigen Tumoren
	Magen- und Darmkrebs	Erhöhte Expression
<b>Hepsin</b>	Prostatakrebs	Signifikante Überexpression
	Eierstockkrebs	Signifikante Überexpression
	Brustkrebs	Erhöhte Expression in Er $\alpha$ positiven Tumoren
	Leberzellkarzinom	Verringerte Expression
<b>Matriptase</b>	Eierstockkrebs	5-18fache Überexpression
	Brustkrebs	Erhöhte Level in späteren Tumorstadien
	Prostatakrebs	Erhöhte Expression
	Gebärmutterhalskrebs	Erhöhte Expression
	Pleuramesotheliomkrebs	Mehr als 800fache Überexpression
	Lungentumore	Expression in bösartigem Gewebe
	Lebertumore	Erhöhte Expression
	Nierentumore	Erhöhte Expression
	Bauchspeicheldrüsenkrebs	Überexpression in hypoxischen Bereichen
	Magenkrebs	Runterregulierte Expression
	Darmkrebs	Runterregulierte Expression, aber erhöhtes Matriptase/HAI-1 Verhältnis
<b>Matriptase-2</b>	Brustkrebs	Allel mit erhöhtem Risiko für Brustkrebs

### 1.1.1. Matriptase (MT-SP1)

Matriptase wurde Anfang der Neunzigerjahre in Brustkrebszellen aufgrund ihrer gelatinolytischen Aktivität entdeckt.<sup>[73]</sup> Die Bezeichnung Matriptase führt auf die trypsinähnliche Funktion des Enzyms durch die Degradation der extrazellulären Matrix zurück. Es gibt ebenso weitere Bezeichnungen für dieses Enzym, MT-SP1, TADG-15, Epithin, und ST14 die teilweise noch bis heute geläufig sind.<sup>[58, 74-76]</sup> Man findet sie im Epithelgewebe einer Vielzahl von Organen.<sup>[77]</sup> Ihre Funktion wird vor allem dem Aufbau und der Differenzierung der Epidermis, des Epithelgewebes und Haarfollikeln zugeschrieben.<sup>[78]</sup> So konnte in einer Studie an Matriptase-defizienten Mäusen nachgewiesen werden, dass sie für das postnatale Überleben durch korrekte Ausbildung epidermaler Barrierefunktionen essentiell ist.<sup>[79]</sup>

Um die Jahrtausendwende wurde in mehreren Gruppen nahezu parallel die Klonierung durchgeführt und es konnte gezeigt werden, dass das Enzym zur Klasse der Typ II Transmembranserinproteasen gehört.<sup>[58, 76, 80, 81]</sup> Es handelt sich hierbei um ein 855 Aminosäuren langes Protein, welches in den Genomen mehrere Säugetiere, zum Beispiel im Mensch, Maus, Schimpanse, Hund und Huhn vorkommt. *In vivo* liegt sie als 95 kDA großes Glykoprotein auf der Zelloberfläche vor das aus mehreren Domänen besteht und zusammen mit seinem natürlichen Inhibitor HAI-1 expremiert wird, der eine wichtige Funktion in der Expression und Regulation einnimmt [Abb. 1.4].<sup>[81, 82]</sup>

Sie besitzt einen kurzen intrazellulären N-Terminus (Aminosäuren 1-54) der keine klassische Signalfunktion besitzt und die Protease in der Zellmembran verankert.<sup>[70]</sup> Ihre Funktion ist noch nicht komplett aufgeklärt, es gibt aber Studien die darauf hindeuten, dass eine Verbindung mit dem Aktincytoskelett besteht.<sup>[83, 84]</sup> Der C-terminale extrazelluläre Teil unterteilt sich in eine SEA Domäne (86-201), zwei CUB Domänen (214-334, 340-447), 4 LDLRa Domänen (452-486, 487-523, 524-561, 566-604) und die katalytischen Domäne (614-855). Matriptase besitzt vier Glykosylierungsstellen (Asn 109, 302, 485, 772), eine SEA Spaltstelle (Gly<sup>149</sup>) und eine Spaltstelle des Zymogen (Arg<sup>614</sup>). Die katalytische Domäne gehört strukturell zur Gruppe der trypsinähnlichen Proteasen mit dem Chymotrypsin (S1) Faltungsmotiv und wird als Zymogen expremiert.<sup>[35]</sup>

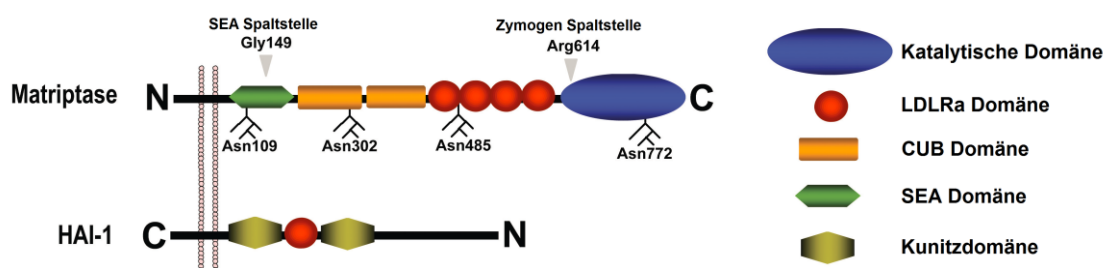


Abbildung 1.4 zeigt Matriptase und ihre einzelnen Domänen. In Blau dargestellt die c-terminale katalytische Domäne, dann die vier LDLRa Domänen, die beiden CUB Domänen und die SEA Domäne. Zu sehen sind auch die vier Glykosylierungsstellen. Mit grauen Pfeilen sind die beiden Spaltstellen die zur Aktivierung der Protease nötig sind markiert. Auch gezeigt ist der zusammen mit Matriptase expremierte Inhibitor HAI-1 mit seinen beiden Kunitzdomänen die für die Inhibition verantwortlich sind und einer LDLRa Domäne dazwischen. Modifiziert nach<sup>[85]</sup>

Der Aktivierungsmechanismus von Matriptase ist sehr komplex und bis heute noch nicht komplett aufgeklärt. Man weiß jedoch, dass er zwei proteolytische Schritte und verschiedene Wechselwirkungen mit der Stammregion beinhaltet. Ebenso spielen die Glykosylierung und der Inhibitor HAI-1 eine Rolle dabei.<sup>[86]</sup> Im ersten Schritt, bei der Aktivierung der Protease wird die SEA Domäne an Gly<sup>149</sup> gespalten.

Durch nicht kovalente Wechselwirkungen innerhalb dieser Domäne bleibt das Enzym trotzdem an der Membranoberfläche verankert.<sup>[87]</sup> In einem zweiten autokatalytischen Schritt wird die katalytische Domäne an Arg<sup>614</sup> gespalten und verbleibt über eine Disulfidbrücke (Cys<sup>604</sup> - Cys<sup>731</sup>) weiterhin mit der Stammregion des Proteins verbunden. Durch Spaltung der Protease in der SEA Domäne, kann diese sich nach der Aktivierung von der Zelloberfläche lösen.<sup>[77]</sup>

Durch Arbeiten mit kombinatorischen Peptidbibliotheken und der Aufklärung ihrer Kristallstruktur konnte gezeigt werden, dass Matriptase eine hohe Substratspezifität besitzt.<sup>[70, 88]</sup> Sie spaltet bevorzugt Substrate die an der P1 Position ein Arginin und an P2 ein Serin oder eine hydrophobe Aminosäure besitzen. An der P3 oder P4 Position sollten sich entweder Arginin/Lysin oder nicht basische Aminosäure befinden, wobei die Reihenfolge austauschbar und von der Orientierung des Substrates in der Bindungstasche abhängig ist. Es konnten mehrere mögliche Zielproteine identifiziert werden, die von Matriptase gespalten werden [Abb. 1.5]. Darunter sind PAR-2, Laminin, Fibronectin, Profilaggrin, Angiomodulin und die Zymogene von uPA und HGF/SF (*hepatocyte growth factor/scatter factor*).<sup>[70, 89-92]</sup> Das uPA/uPAR System ist für die Umwandlung der extrazellulären Matrix verantwortlich, da es die Aktivierung von Plasminogen reguliert. Weiterhin reguliert es auch die Adhäsionseigenschaften der Zelle durch Wechselwirkung mit Vitronectin und durch Modulation von Integrinen und besitzt die Fähigkeit, Signaltransduktionskaskaden auszulösen, die die Migration und Proliferation der Zelle fördern.<sup>[93, 94]</sup>

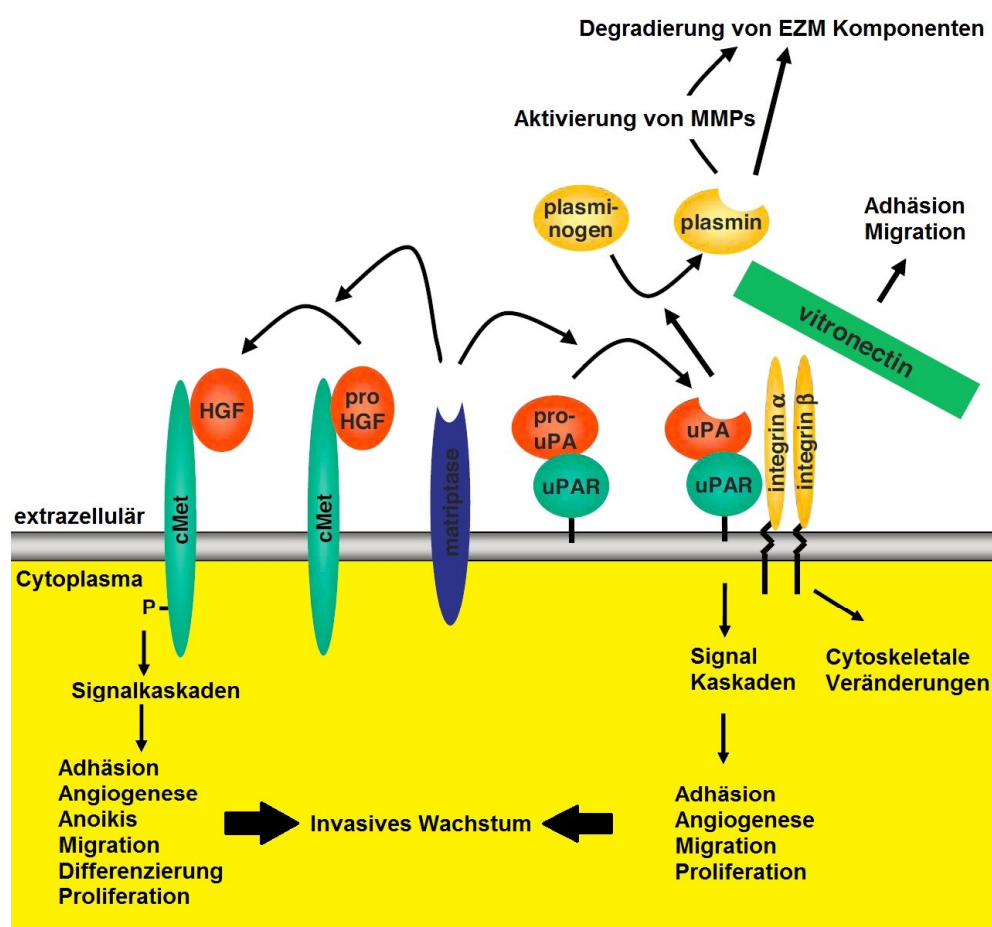


Abbildung 1.5 Matriptase vermittelte Aktivierung von pro-HGF/SF und pro-uPA nimmt eine zentrale Funktion in zwei wichtigen Signalwegen ein, die für Modifikation der extrazellulären Matrix, der Adhäsion, der Angiogenese und Proliferation von Zellen verantwortlich sind. Eine Dysregulierung des uPA/uPAR Systems und des cMet Rezeptors steht oft in Verbindung mit einem invasivem Tumorwachstum und Metastasierung. Modifiziert nach <sup>[95]</sup>

HGF/SF aktiviert die Rezeptor-Tyrosin-Kinase Met, die unterschiedliche Signalkaskaden wie z.B. den Ras-MAPK, P13K, Src- und Stat3 Weg aktiviert und damit verantwortlich ist für eine ganze Reihe von zellulären Veränderungen, die zum invasiven Wachstum der Zelle führen.<sup>[96, 97]</sup> Eine Dysregulierung dieser Signalwege findet sich auch bei vielen Krebsarten wieder und führt zu starkem Tumorwachstum und Metastasierung.<sup>[98, 99]</sup> Durch Studien an Tumorzellen konnte Matriptase als eine Schlüsselkomponente dieser beiden Signalwege identifiziert werden. Dabei wurde mit siRNA oder Inhibitoren ihre Aktivität herunterreguliert, was zu einem verlangsamten invasivem Tumorwachstum führte.<sup>[100]</sup> Ebenso führte eine vermehrte Expression der Protease in transgenen Mäusen zum spontanen Auftreten von Plattenepithelkarzinomen.<sup>[101]</sup> Das weit verbreitete Vorkommen von erhöhten Matriptaselevel in Tumoren epithelialen Ursprungs und die oft damit verbundene schlechte Prognose für Patienten, machen sie zu einem interessanten Molekül für diagnostische und therapeutische Verfahren in der Krebstherapie.<sup>[102, 103]</sup> Erste Studien mit Inhibitoren die niedrige nanomolare Inhibitionskonstanten gegen Matriptase besitzen konnten zeigen, dass eine Verabreichung dieser Substanzen zu einer Verringerung des Tumorwachstums und Metastasenbildung führte.<sup>[104, 105]</sup> Es ist bereits eine Reihe von verschiedenen Inhibitoren gegen diese Protease bekannt. Von kleinen chemisch synthetisierten Peptidomimetika<sup>[104, 105]</sup> über modifizierte natürliche Proteaseinhibitoren wie Ecotin<sup>[106]</sup>, Eglin C<sup>[107]</sup>, SFTI<sup>[108, 109]</sup> bis hin zu Antikörpern.<sup>[110]</sup> Eine Klasse von potenziellen Inhibitoren, die bisher noch nicht auf ihre Möglichkeit hin untersucht worden ist, Matriptase zu inhibieren, sind die Cystinknoten Miniproteine.



## 1.2. Cystinknoten-Miniproteine

Cystinknoten Miniproteine gehören zu einer Familie von Proteinen, die zwischen 26 und 48 Aminosäuren lang sind und in einer Vielzahl von Organismen wie Pilzen, Mollusken, Insekten oder Spinnen vorkommen.<sup>[111]</sup> Sie besitzen verschiedenste Bioaktivitäten. So wirken einige antimikrobiell<sup>[112]</sup>, neurotoxisch<sup>[113]</sup>, besitzen uterotonische Aktivität<sup>[114]</sup> oder inhibieren Trypsin wie das Miniprotein EETI-II aus der Spritzgurke *Ecballium elaterium*.<sup>[115, 116]</sup> Allen ist gemein, dass sie ein Cystinknoten Strukturmotiv besitzen. Dabei wird das Peptidrückgrat über zwei Disulfidbrücken miteinander vernetzt und von einer dritten Disulfidbrücke durchspannt, die den eigentlichen Knoten ausbildet [Abb. 1.6].

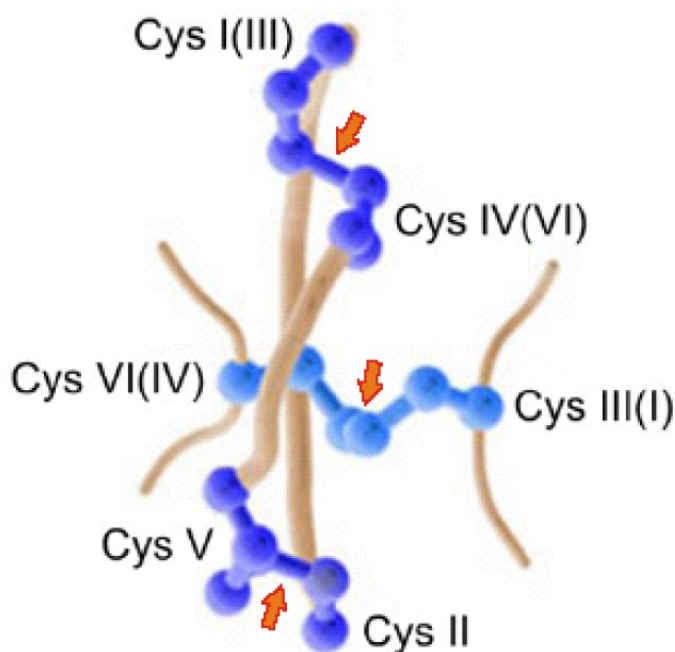


Abbildung 1.6 Schematische Darstellung eines Cystinknotens. Die zwei dunkelblauen Disulfidbrücken bilden einen Ring. Alle Cysteine sind über ein Peptidrückgrat miteinander verbunden. Die dritte Disulfidbrücke, hier hellblau dargestellt, wird innerhalb des Ringes gebildet. Die Nummerierung der Cysteine gibt die Reihenfolge an, in der sie im Peptidrückgrat vorkommen. Es gibt unterschiedliche Konnektivitäten für die verschiedenen Kategorien von Cystinknoten Proteinen. Nummerierung der Cysteine für ICK und CCK. In Klammern Nummerierung für Wachstumsfaktoren. Modifiziert nach<sup>[117]</sup>

Die Klasse der Cystinknoten Proteine lässt sich topologisch in drei weitere Gruppen unterteilen. Zur Gruppe eins gehören die Wachstumsfaktor Cystinknoten Proteine.<sup>[118]</sup> Vertreter dieser Gruppe sind Proteine wie NGF<sup>[119]</sup>, TGF- $\beta$ 2<sup>[120]</sup> und PDGF-BB.<sup>[121]</sup> Die zwei weiteren Gruppen sind die Inhibitor Cystinknoten (ICK)<sup>[122]</sup> und die zyklischen Cystinknoten (CCK)<sup>[123]</sup>, die als *knottins*<sup>[124]</sup> bezeichnet werden. Diese beiden Gruppen unterscheiden sich nur dadurch, dass bei den CCK das Peptidrückgrat zyklisiert ist und die ICK einen N-Terminus und C-Terminus besitzen. Bei den Wachstumsfaktor Proteinen ist die durchspannende Disulfidbrücke von Cystein I und IV mit mehreren  $\beta$ -Faltblattstrukturen assoziiert. Die ICK und CCK besitzen ein dreisträngiges  $\beta$ -Faltblatt und eine  $3_{10}$  Helix. Die Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen III und VI ist diejenige, die den Knoten ausbildet [Abb. 1.7]. Das ursprüngliche Faltungsmotiv, auf das sich alle Cystinknoten Miniproteine zurückführen lassen, ist das sogenannte Cystin stabilisierte  $\beta$ -Faltblatt (CSB) Motiv, welches eine hohe Stabilität gewährleistet.<sup>[125]</sup> So sind einige Miniproteine sehr stabil gegenüber extremen pH Werten, thermischer Denaturierung und proteolytischem Abbau.<sup>[126-128]</sup>



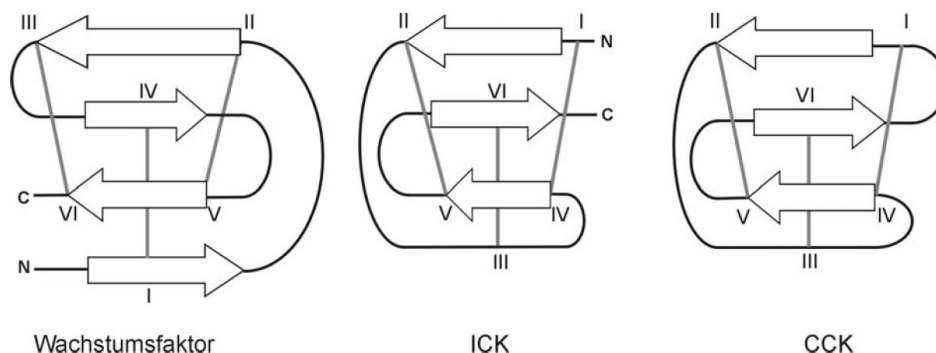


Abbildung 1.7 Schematische Darstellung der Topologie der drei verschiedenen Gruppen von Cystinknoten Proteinen Wachstumsfaktor, Cystinknoten Proteine, Inhibitor Cystinknoten (ICK) Proteine und zyklische Cystinknoten (CCK) Proteine. Die Cystein Reste sind startend vom N-Terminus mit I-VI gekennzeichnet.  $\beta$ -Faltblatt Stränge sind als Pfeile dargestellt. Modifiziert nach <sup>[129]</sup>

Aufgrund dieser Stabilität und Struktur sind Miniproteine besonders dafür geeignet um als molekulares Grundgerüst (*scaffold*) für neu funktionalisierte Moleküle in Frage zu kommen.<sup>[130-132]</sup> So können die Inhibitorschleifen von Miniproteinen mittels chemischer oder gentechnischer Methoden gegen andere Sequenzen ohne Verlust der strukturellen Integrität ausgetauscht werden.<sup>[133-135]</sup>

### 1.2.1. MCoTI-II

Das Miniprotein MCoTI-II ist ein im Kürbisgewächs *Momordica cochinchinensis* vorkommender Trypsininhibitor.<sup>[136-138]</sup> Die Inhibitionskonstante liegt im subnanomolaren Bereich. *In vivo* liegt es als 34 Aminosäuren langes zyklisches Molekül vor [Abb. 1.8]. Beim *Protein Engineering* wird aber meistens eine um 5 Aminosäuren verkürzte, offenkettige Variante (oMCoTI-II) benutzt. Diese Variante weist eine fast genauso hohe Stabilität und Bindungseigenschaften gegenüber Trypsin auf wie die zyklische und ermöglicht eine einfache chemische Synthese des Miniproteins.<sup>[139]</sup> Durch Austausch einzelner Aminosäuren in der Inhibitorschleife konnten neue Moleküleigenschaften generiert werden. So wurden mittels Protein Engineering neue Inhibitoren gegen humane Mastzelltryptase<sup>[140]</sup>, Leukozyten Elastase<sup>[141]</sup>, Chymotrypsin oder auch gegen die FMDV (*food and mouth disease virus*) 3C-Protease gefunden.<sup>[142]</sup> Diese bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass MCoTI-II ein geeignetes *scaffold* für die Entwicklung neuer Inhibitoren von Proteasen wie z.B auch von TTSP's ist.

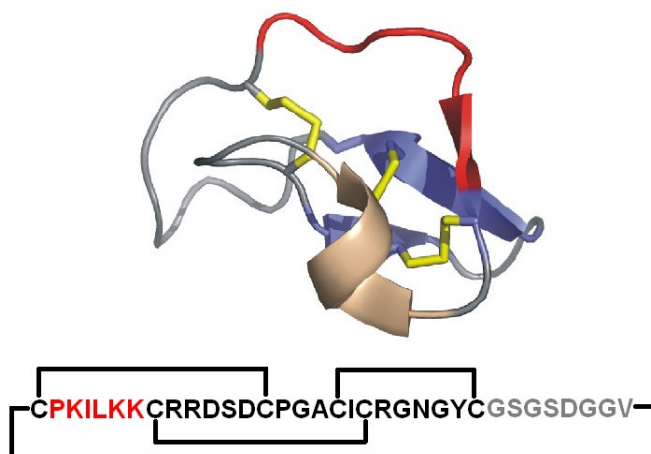


Abbildung 1.8 Dreidimensionale Darstellung von cMCoTI-II. Gelb dargestellt die drei Disulfidbrücken, blau die  $\beta$ -Faltblattstrukturen, braun die  $3_{10}$  Helix und rot die variable Inhibitorschleife, die aus sechs Aminosäuren besteht. Darunter ist die Sequenz des Proteins mit den unterschiedlichen Konnektivitäten und Schleifen. Modifiziert nach <sup>[143]</sup>

### 1.3. Protein Engineering

Durch Einsatz verschiedener biochemischer Methoden lassen sich heutzutage die Eigenschaften von Proteinen so modifizieren, dass ihre Funktionalität gegenüber ausgewählten Zielmolekülen verbessert oder auch verändert werden kann.<sup>[144, 145]</sup> Dabei können unterschiedliche Methoden wie das rationale Protein Design oder die gerichtete Evolution angewendet werden.<sup>[146]</sup>

#### 1.3.1. Rationales Protein Design

Für das rationale Protein Design werden Kenntnisse über die Struktur und Funktion des zu modifizierenden Proteins benötigt.<sup>[147]</sup> Diese können durch NMR Spektroskopie, Kristallographie oder computergestützte Verfahren die eine dreidimensionale Charakterisierung des Proteins ermöglichen, erhalten werden.<sup>[148]</sup> Ist die Struktur des Proteins bekannt, können durch Modellierungen am Computer<sup>[149]</sup> oder zielgerichtete Mutagenese<sup>[150]</sup> einzelne Aminosäuren ausgetauscht oder auch hinzugefügt und deletiert werden, diese dann experimentell auf ihrer gewünschten Eigenschaften hin untersucht werden.<sup>[151]</sup> Ein Nachteil des rationalen Design ist, dass die benötigten Kenntnisse es oft nur erlauben, eine überschaubare Zahl an Kandidaten zu untersuchen.<sup>[152]</sup> Ebenso kann es geschehen, dass durch den Austausch einzelner Aminosäuren in der Sequenz, die dreidimensionale Struktur des Proteins sich nicht ausbilden kann und damit seine Funktion nicht mehr gegeben ist.<sup>[153]</sup>

Ein breites Anwendungsfeld für das rationale Design stellt die Erhöhung oder Änderung der katalytischen Aktivität von Enzymen gegenüber ausgewählten Substraten in der Biotechnologie dar.<sup>[154]</sup> So konnte durch den Austausch einer einzigen Aminosäure die Substratspezifität von Trypsin erhöht werden.<sup>[155]</sup> Ebenso konnte eine höhere Aktivität der Superoxiddismutase, die bereits eines der schnellsten natürlichen Enzyme darstellt, erzeugt werden.<sup>[156]</sup>

Bei der Lipase B aus *Candida antarctica* konnten die Enantioselektivitäten gegenüber unterschiedlichen Substraten gesteigert<sup>[157]</sup> oder auch die Funktion des Enzyms in eine C-C Bindungen knüpfende Aldolase umgewandelt werden.<sup>[158]</sup> Ein weiteres Beispiel ist das Einfügen der Aminosäure Cystein in die S1 Tasche von Subtilisin. Durch chemische Modifikationen an dieser Stelle kann damit die Substratspezifität der Protease auf die gewünschten Aminosäuren zugeschnitten werden.<sup>[159]</sup>

Neben der Änderung enzymatischer Aktivitäten wird das rationale Protein Design auch bei deren Inhibitoren angewandt. So wurde es auch schon erfolgreich bei Miniproteinen eingesetzt da ihre Funktion und die Struktur häufig gut bekannt sind.<sup>[132]</sup> Es konnten zum Beispiel RDG-Peptidomimetika erzeugt werden, die Funktionalität gegenüber Integrinen aufweisen.<sup>[160]</sup> Ebenso wurden Thrombopoietin Antagonisten in verschiedenen Miniproteinen dargestellt.<sup>[161, 162]</sup> Durch Veränderung der Aminosäuren in der Inhibitorschleife verschiedener Proteaseinhibitoren wie EeTI-II konnten neue inhibitorische Eigenschaften gegenüber anderen Proteasen erzeugt werden. Durch Einfügen einer Proteinsequenz, die Pankreaselastase inhibiert, in das Miniproteingerüst wurde ein neuer stabiler Inhibitor gegen diese Protease erzeugt.<sup>[135]</sup> Ebenso wurde bei dem in dieser Arbeit verwendeten Miniprotein MCoTI-II durch Austausch einzelner Aminosäuren ein neuer Inhibitor gegen humane Mastzelltryptase erzeugt.<sup>[140]</sup>

### 1.3.2. Gerichtete Evolution

Eine andere Methode zur Erzeugung neuer Miniproteinvarianten bietet die gerichtete Evolution.<sup>[163]</sup> Dabei sind im Gegensatz zum rationalen Design keine Vorkenntnisse über die Moleküle und ihre Struktur nötig. Diese Methode beruht auf der Erzeugung einer möglichst großen Anzahl an unterschiedlichen Varianten durch z.B. *error prone* PCR, *DNA-shuffling* oder auch Mutatorstämme.<sup>[164]</sup> Diese sogenannten Bibliotheken können durchmustert werden, um Proteine mit den gewünschten Funktionen zu finden. Diese isolierten Varianten können dann in weiteren Selektionsrunden eingesetzt werden bis die Proteine die gesuchten Funktionen besitzen.<sup>[165]</sup> Dabei werden *in vitro* Selektionsdrücke auf die Proteine ausgeübt um gewünschte Eigenschaften wie eine veränderte Substratspezifität<sup>[166]</sup>, Lösemittelstabilität<sup>[167]</sup> oder höhere Bindungsaffinitäten<sup>[168]</sup> zu erhalten.

Erstmals erwähnt wurde das Prinzip der gerichteten Evolution im Jahr 1967 bei Untersuchungen selbstreplizierender RNA-Moleküle des Phagen Q $\beta$ .<sup>[169]</sup> Die erste Anwendung wurde aber erst 1992 anhand eines modifizierten Elastaseinhibitors beschrieben.<sup>[170]</sup> Auch bei Miniproteinen wurde die gerichtete Evolution schon erfolgreich angewandt. So wurden einzelne Schleifen des Proteaseinhibitors EeTI-II mutiert, um die Variabilität des GPNG  $\beta$ -turns herauszufinden<sup>[134]</sup>, oder auch zur Identifikation von Konsensussequenzen für die Inhibition von Trypsin.<sup>[171]</sup> Bei einer auf 23 Aminosäuren verkürzten Variante Min-23 wurde ebenfalls eine Schleife randomisiert und erfolgreich Binder unterschiedlicher Zielmoleküle wie AMA-1 ein Malaria Antigen, Tom70 ein mitochondriales Membran Protein und das HIV Virus Protein Nef hin erhalten.<sup>[172]</sup>

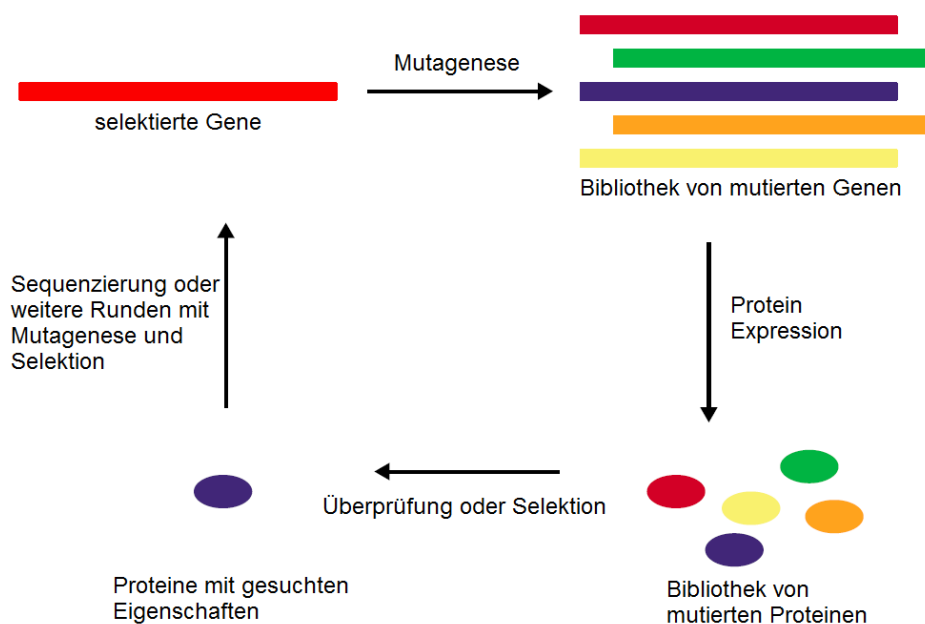


Abbildung 1.9 Generelle Strategie bei der gerichteten Evolution. Das Gen auf dem das interessierende Protein kodiert ist wird mutiert und damit eine Bibliothek verschiedener Varianten erzeugt. Diese werden mit Hilfe von Verfahren exprimiert, die eine Genotyp Phänotypkopplung ermöglichen. Aus diesem Pool wird das Protein mit den gesuchten Eigenschaften isoliert. Anschließend können die isolierten Proteine sequenziert oder in weiteren Runden mutiert und selektiert werden. Modifiziert nach<sup>[173]</sup>

Für die Anwendung der gerichteten Evolution ist es nötig, über ein leistungsstarkes Durchmusterungsverfahren zu verfügen, das es ermöglicht, Millionen von Varianten in kurzer Zeit zu durchmustern und das gleichzeitig eine Genotyp-Phänotyp Kopplung besitzt, um die isolierten Kandidaten aus der Bibliothek vermehren zu können.

Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher Verfahren wie z.B. die *in vitro* Methoden *ribosomal display*<sup>[174, 175]</sup> und das *mRNA display*.<sup>[176]</sup> Bei diesen beiden Methoden ist es möglich, Bibliotheken mit bis zu  $10^{14}$  unterschiedlichen Varianten zu erzeugen.<sup>[177]</sup> Vorteil dieser Verfahren ist, dass sie sich leicht mit einer Mutagenese zwischen den einzelnen Selektionsrunden kombinieren lassen und so die Diversität der ursprünglichen Bibliothek vergrößern. Nachteile bestehen in der Hydrolyse und Nukleaseempfindlichkeit der eingesetzten mRNA.

Im Gegensatz dazu existieren es auch die zellbasierten Verfahren wie das *phage display*<sup>[178]</sup>, das *bacterial surface display*<sup>[179]</sup> und das *yeast surface display*.<sup>[180]</sup> Das *phage display* ist das derzeit am häufigsten angewendete Verfahren zur Genotyp-Phänotyp Kopplung. Die bekannteste Variante ist die Präsentation der Proteine auf dem pIII Hüllprotein des filamentösen *E.coli* Phagen M13.<sup>[181]</sup> Daneben gibt es aber eine Vielzahl weiterer Varianten.<sup>[182-184]</sup> Die Selektion der Phagenbibliotheken erfolgt über das sogenannte *panning*.<sup>[185]</sup> Dabei werden die Phagen mit dem immobilisierten Zielmolekül inkubiert. Nach der Elution werden die bindenden Phagen zur Infektion von *E.coli* verwendet und dadurch über mehrere Selektionsrunden angereichert. Beim *bacterial surface display* wird das gewünschte Protein als Fusion mit einem Translokatorprotein, welches auf der Bakterienoberfläche verankert ist, expremiert.<sup>[186]</sup> Die Präsentation der Proteine erfolgt meistens auf *E.coli*, ist aber auf anderen gramnegativen Arten als auch auf grampositiven Bakterien möglich.<sup>[187]</sup> Ein Nachteil dieser beiden Verfahren ist die Limitierung der Bibliotheken auf  $10^{10}$  durch die Transformationseffizienz von *E.coli*. Ebenso haben die Faltung, Transport, Toxizität, Aggregation und proteolytische Degradation der jeweiligen Proteinvarianten einen Einfluss auf die Diversität der Bibliotheken.

Auf das *yeast surface display*, das in dieser Arbeit Anwendung gefunden hat wird im nächsten Abschnitt ausführlich eingegangen.

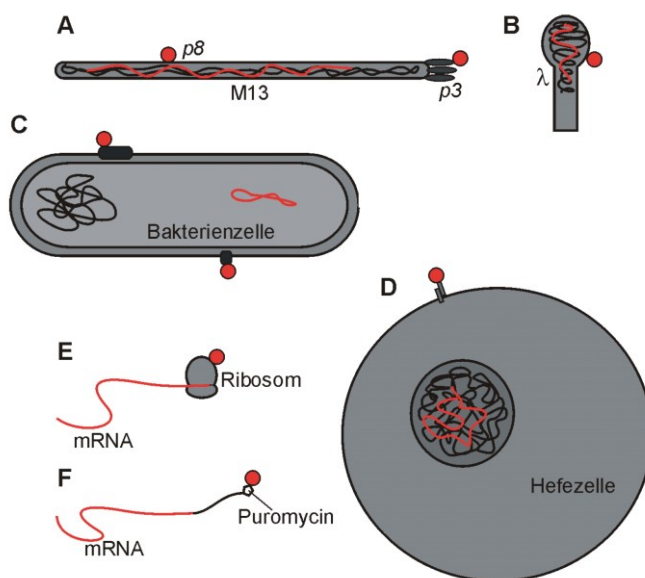


Abbildung 1.10 Schematische Darstellung unterschiedlicher Genotyp-Phänotyp-Kopplungsstrategien bei der gerichteten Evolution (A) Phage Display auf dem Phagen M13 über die Hüllproteine pVIII oder pIII, (B) Phage Display auf dem Phagen Lambda ( $\lambda$ ), (C) Bacterial Surface Display über verschiedene Zelloberflächenproteine, (D) Yeast Surface Display über Aga1p/Aga2p, (E) Ribosomal Display, (F) mRNA Display über Puromycin. Der Genotyp und Phänotyp sind jeweils in Rot dargestellt. Modifiziert nach <sup>[188]</sup>

## 1.4. Yeast Surface Display

Das *yeast surface display* (YSD) ist eine Methode für die Präsentation von Proteinen auf der Hefe *S. cerevisiae*. Es wurde im Jahr 1997 in der Arbeitsgruppe von K. D. Wittrup entwickelt.<sup>[180]</sup> Das *yeast surface display* ist eine gute Methode für das Screening und die Isolierung von Antikörpern, die als *single chain variable fragment* (scFv)<sup>[189]</sup> oder Fab-Fragmente<sup>[190, 191]</sup> gegen ausgewählte Targets präsentiert werden. Es wurde bereits eine Reihe von Antikörpern gegen verschiedene Proteine wie Huntington<sup>[192]</sup>, CEA (*carcinoembryonic antigen*)<sup>[193]</sup>, Botulinum Neurotoxin<sup>[194]</sup> und vielen weiteren isoliert.<sup>[195-197]</sup> Mit Hilfe dieser Displaymethode konnten auch hochaffine Antikörper im femtomolaren Bereich gefunden werden.<sup>[198]</sup>

Ein Vorteil des YSD besteht darin, dass *S. cerevisiae* ein Eukaryont ist und im Endoplasmatischen Retikulum Chaperone enthält, die u.a. Qualitätskontrollfunktion haben und nur korrekt gefaltete und glykosylierte Proteine an die Oberfläche gelangen lassen.<sup>[199]</sup> Dadurch ist es auch möglich, eine Vielzahl weiterer Proteine wie zum Beispiel EGFR<sup>[200]</sup>, Fibronectin Domänen<sup>[201]</sup>, oder auch Miniproteine, wie das *Agouti Related Protein* (AGRP)<sup>[202]</sup> und EeTI<sup>[203, 204]</sup> in funktionaler Form auf der Hefeoberfläche zu präsentieren. Beim YSD werden die Proteine als Fusion an die Adhäsionsuntereinheit des Agglutinin Proteins Aga2p exprimiert und kovalent über zwei Disulfidbrücken an Aga1p gebunden, das wiederum selber über einen GPI Anker mit der Zellwand verbunden ist. Damit ist die Genotyp-Phänotyp Kopplung gewährleistet.<sup>[205]</sup> Die Expression des Fusionsprotein und Aga1p liegt unter Kontrolle des Galaktose induzierbaren GAL1 Promotors, wobei das Gen für das Fusionsprotein auf einem Hefe/*E.coli* Schaukelploid mit Auxotrophiemarker kodiert und von zwei Affinitätstags flankiert ist. Die kodierende Sequenz für die Aga1p Untereinheit ist hingegen stabil ins Genom integriert. Pro Hefezelle werden ca.  $10^4$  bis  $10^5$  Proteine präsentiert.

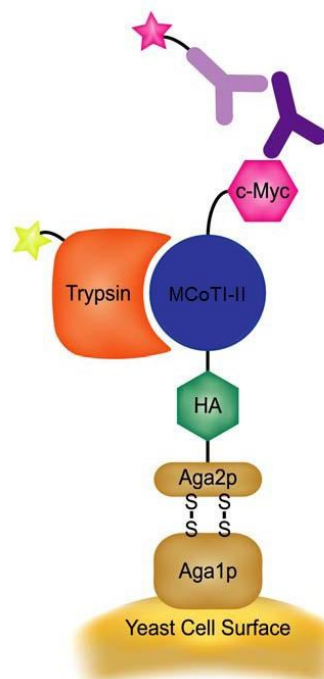


Abbildung 1.11 Hefeoberflächenpräsentation am Beispiel des MCoTI-II Miniprotein mit seinem natürlichen Zielmolekül Trypsin. Das Aga1p ist mit der Zellwand über einen GPI Anker verbunden und bildet mit dem Aga2p eine kovalente Bindung über zwei Disulfidbrücken aus. Das Miniprotein wird N-Terminal von einem HA-Tag und C-Terminal von einem Myc-Tag flankiert. Das Zielmolekül ist biotinyliert und mit Streptavidin-Phycoerythrin markiert (gelber Stern). Ebenso wird der Myc-Tag über einen direkten Anti Myc und indirekten FITC (rosa Stern) gelabelten Antikörper markiert. Durch Anregung und Emission der beiden Fluorophore können durchflusszytometrische Untersuchungen und Sortierungen durchgeführt werden. Modifiziert nach Lahti et al.<sup>[204]</sup>

Ein Vorteil des YSD ist die Durchmusterung von Bibliotheken mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS). Durch die Affinitätstags am Fusionsprotein und Biotinylierung des Targetprotein wird eine zweifarbige Markierung ermöglicht und dadurch eine Normalisierung der Expression unterschiedlicher Varianten, die wiederum eine feine Diskriminierung der einzelnen Klone ermöglicht.<sup>[206]</sup> Weiter können auch einzelne Varianten mit erhöhter Stabilität und Löslichkeit im FACS aussortiert und damit isoliert werden, da diese Eigenschaften häufig mit einer erhöhten Expression auf der Hefeoberfläche einhergehen.<sup>[207, 208]</sup>

Ein weiterer Vorteil des YSD ist, dass die Dissoziationskonstanten einzelner Mutanten direkt auf der Hefeoberfläche bestimmt werden können. Dadurch entfällt die Notwendigkeit der löslichen Produktion und Aufreinigung der einzelnen Klone. Die erhaltenen Daten der Titration auf der Hefeoberfläche stimmen mit den erhaltenen Daten aus anderen Methoden, wie z.B. der *Surface Plasmon Resonance* überein.<sup>[209]</sup> Ein Nachteil des YSD war bisher die geringe Transformationseffizienz, die dazu führte, dass kombinatorische Bibliotheken dadurch lediglich einige Millionen verschiedene Varianten enthielten. Es gibt nur wenige Publikationen mit größeren Bibliotheken die aus  $10^9$  oder mehr Varianten bestehen.<sup>[210]</sup> Durch effizientere Transformationsprotokolle<sup>[211]</sup> und Paarung von haploiden Hefestämmen<sup>[190]</sup> können heutzutage problemlos Bibliotheken mit weit mehr als  $10^9$  Varianten erzeugt werden.

## 1.5. Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten auf Basis des Miniproteins oMCoTI-II als *scaffold* durch Mutationen der Inhibitorschleife neue hochaffine und selektive Proteaseinhibitoren gegen die therapeutisch interessante Typ II Transmembranserinprotease MT-SP1 gefunden werden.

Dazu sollte zuerst die zyklische Variante von MCoTI-II aus *Momordica cochinchinesis* isoliert und die offenkettige Variante synthetisiert und auf ihre Inhibitionskonstanten bezüglich MT-SP1 untersucht werden. Ausgehend von diesen Basisdaten sollten dann die zwei Herangehensweisen des *Protein Engineering* angewandt werden.

Zuerst sollte das Rationale Protein Design durch Modellierung eines MCoTI-II / Matriptase Komplexes und Synthese der ausgewählten Mutanten, durchgeführt werden. Dann sollte die evolutive Optimierung durch Erzeugung kombinatorische Miniprotein-Bibliotheken und Screening mittels *yeast surface display* angewandt werden.

Die daraus isolierten und synthetisierten Mutanten des Miniprotein MCoTI-II sollten anschließend mit Hilfe enzymkinetischer Methoden hinsichtlich ihrer Inhibitionskonstante gegen Matriptase und andere Proteasen charakterisiert werden.

## 2. Material

### 2.1. Bakterien und Hefestämme

*Escherichia coli*

**DH5α** (Quelle: Fa. Invitrogen)

[F-  $\phi$ 80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoAsupE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-]

**BL21-CodonPlus(DE3)-RP** (Quelle: Agilent Technologies)

[F- *ompT* hsdS(rB- mB-) dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [*argU proL* Camr]]

*Saccharomyces cerevisiae*

**EBY100** (Quelle: Fa. Invitrogen)

[a *GAL1-AGA1::URA3 ura3-52 trp1 leu2\_1 his3\_200 pep4::HIS2 prb1\_1.6R can1 GAL*, Trp-Leu-]

### 2.2. Plasmide

#### 2.2.1. pET42dest His-Matriptase 596\_855

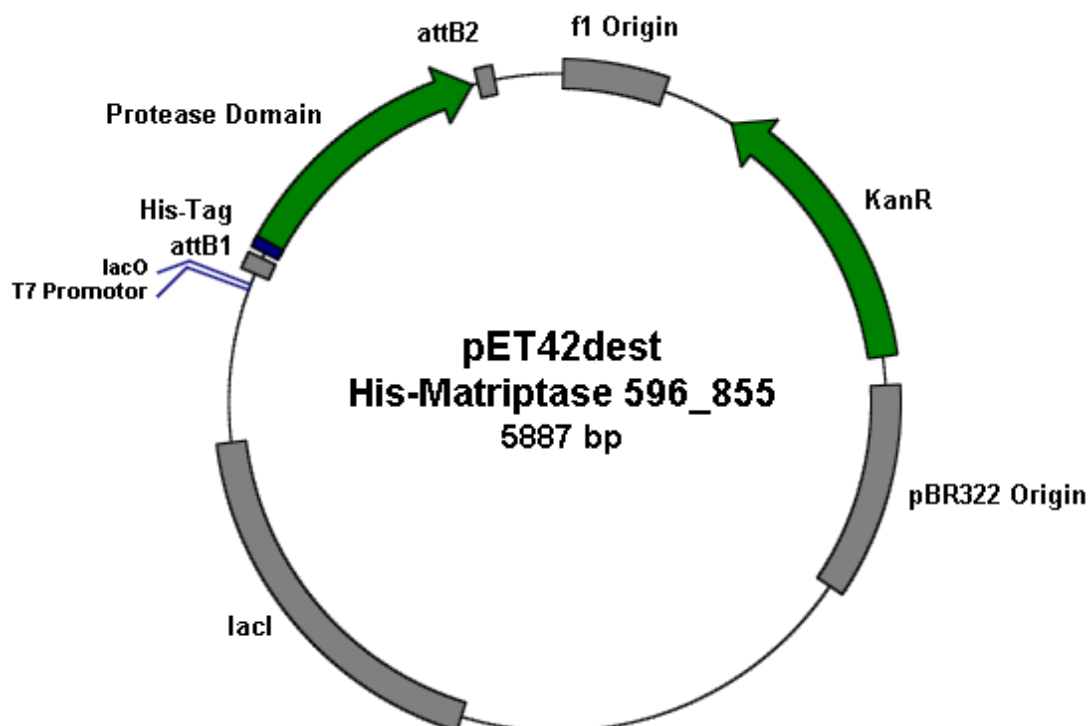


Abbildung 2.1 Genetische Karte des Vektors pET42dest His-Matriptase 596\_855. Die Pfeilrichtungen geben die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente an. *f1 Origin*: Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1, *KanR*: codierende Sequenz für die Kanamycinresistenz, *pBR322Origin*: Replikationsursprung des Vektors pBR322, *lacI*: codierende Sequenz für den *Escherichia coli* lac Repressor, *lac O*: Promotor/Operator-Region des Lactose-Operons, *attB1/2*: Rekombinationsstellen für die Gateway® Clonase, *His-tag*: codierende Sequenz für 6 Histidine, *Protease Domain*: katalytische Domäne der humanen Matriptase von Aminosäure 596 bis 855

Der Vektor pET42dest His-Matriptase 596\_855 wurde von der Fa. Merck zur Verfügung gestellt. Er ist ein Derivat des pET42 Vektors der als Expressionsstamm in Bakterien mit T7-RNA Polymerase Verwendung findet und unter Kontrolle des Lactose Operons steht. Die mit einem N-terminalen His-tag versehene Proteasedomäne wurde mit Hilfe der Gateway<sup>®</sup> Technologie der Fa. Invitrogen in den Vektor rekombiniert. Das Plasmid codiert ebenfalls für eine Kanamycinresistenz.

### 2.2.2. pCT EGFR

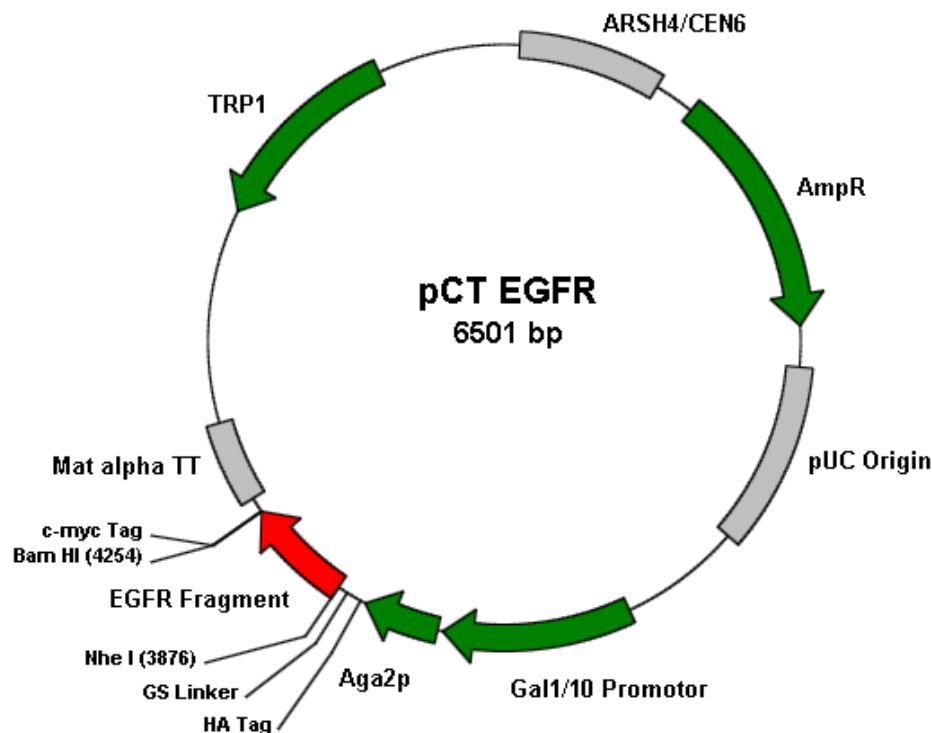


Abbildung 2.2 Genetische Karte des Vektors pCT-EGFR. Die Pfeilrichtungen geben die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente an. *Trp1*: Gen für die Phosphoribosylanthranilate Isomerase (Auxotrophiemarker), *ARSH4/CEN6*: Replikationsursprung für *S. cerevisiae*, *AmpR*: Gen für die  $\beta$ -Lactamase (Antibiotikumresistenz), *pUC ori*: Replikationsursprung für *E. coli*, *Gal1/10*: Region des Galaktosepromotors, *Aga2p*: Kodierende Sequenz des Agglutinin2p zur Oberflächenpräsentation, *HA-Tag* kodierende Sequenz für das Hämagglutinin-Epitop, *GS Linker*: Abstandshalter aus einer dreifachen Wiederholung eines Motives aus vier Glycinen und einem Serin, *EGFR-Fragment*: kodierende Sequenz eines Epidermal Growth factor Receptor-Fragments, *c-myc-Tag*: kodierende Sequenz für das myc-Epitop, *NheI*, *BamHI*: Schnittstellen für die jeweiligen Restriktionsendonukleasen, *Mat alpha TT*: Terminationssequenz für die Transkription.

Der Vektor pCT-EGFR wurde von der Arbeitsgruppe von Jennifer Cochran zur Verfügung gestellt.<sup>[212]</sup> Bei diesem Vektor handelt es sich um ein Schaukelplasmid, welches sowohl einen Replikationsursprung für Hefen (ARSH4/CEN6) als auch für Bakterien (pUC ori) beinhaltet. Dies ist sinnvoll, da der Replikationsursprung in Hefe nur eine einzelne Kopie pro Zelle erzeugt und so eine Retransformation zur Amplifikation in Bakterien unumgänglich ist. Als Selektionsmarker dient in Hefen das für die Tryptophansynthese essentielle *Trp1* Gen. In Bakterien erfolgt die Selektion über das Ampicillinresistenz vermittelnde Gen der  $\beta$ -Lactamase. Die Induktion des *S. cerevisiae* erfolgt durch den Galactose Promoter (Gal1/10). Hinter dem Promoter befindet sich der Teil des Agglutinins, welcher den Membrananker zur Oberflächenpräsentation darstellt (Aga2p), an dem das Insert fusioniert ist. Vor dem Insert befindet sich eine Schnittstelle zur Abspaltung des präsentierten Konstruktes durch den Faktor Xa. Darauf folgt ein Hämagglutinin Epitop, welches für eine



Antikörpermarkierung zur Überprüfung der Präsentation von Aga2p auf der Oberfläche genutzt werden kann. Danach ist ein Verbindungsglied aus einer dreifachen Wiederholung eines Motivs aus vier Glycinen und einem Serin integriert welches dem präsentierten Konstrukt einen Abstand zur Zelloberfläche verschafft.

Es schließt sich eine Insertsequenz an, die durch eine *NheI* und eine *Bam* HI Restriktionsschnittstelle entfernt und durch eine andere kodierende Sequenz für ein zu präsentierendes Protein ersetzt werden kann. Um die Oberflächenpräsentation und die Richtigkeit des Leserahmens zu kontrollieren, befindet sich dahinter die kodierende Sequenz für ein myc-Epitop, welches durch Antikörper markiert und nachgewiesen werden kann. Dahinter sind noch zwei Stopcodone angefügt.

### 2.2.3. pCT ocMCoTI-II

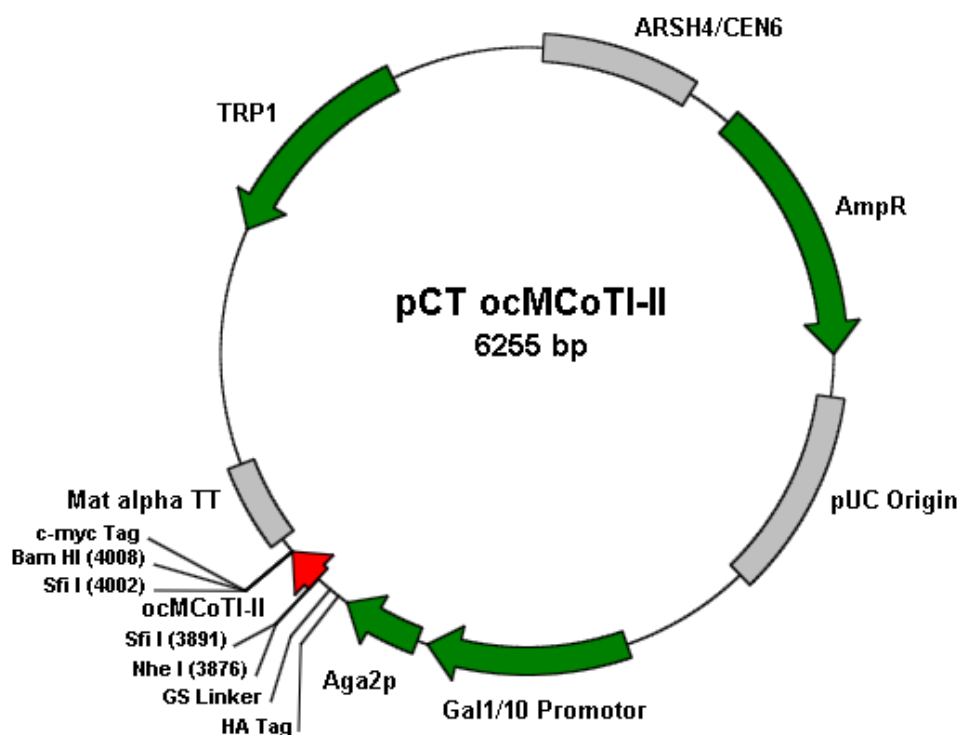


Abbildung 2.3 Genetische Karte des Vektors pCT-ocMCoTI-II. Die Pfeilrichtungen geben die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente an. *Trp1*: Gen für die Phosphoribosylanthranilate Isomerase (Auxotrophiemarker), *ARSH4/CEN6*: Replikationsursprung für *S. cerevisiae*, *AmpR*: Gen für die  $\beta$ -Lactamase (Antibiotikumresistenz), *pUC ori*: Replikationsursprung für *E. coli*, *Gal1/10*: Region des Galaktosepromotors, *Aga2p*: Kodierende Sequenz des Agglutinin2p zur Oberflächenpräsentation, *HA-Tag* kodierende Sequenz für das Hämagglutinin-Epitop, *GS Linker*: Abstandshalter aus einer dreifachen Wiederholung eines Motives aus vier Glycinen und einem Serin, *ocMCoTI-II*: codierende Sequenz für ocMCoTI-II und seine Varianten, *c-myc-Tag*: kodierende Sequenz für das myc-Epitop, *NheI*, *BamHI*, *SfiI*: Schnittstellen für die jeweiligen Restriktionsendonukleasen, *Mat alpha TT*: Terminationssequenz für die Transkription.

Der Vektor pCT-ocMCoTI-II wurde von Niklas Weber im Rahmen seiner Diplomarbeit aus dem pCT-EGFR erzeugt und diente zur Kontrolle.<sup>[213]</sup> Dabei wurden durch homologe Rekombination das Miniprotein und 2 *SfiI* Schnittstellen eingefügt. Ebenso wurden in dieser Arbeit auf diese Weise die MCoTI-II Bibliotheken generiert. Dabei wurde zuerst das EGFR Fragment mit *NheI* und *BamHI* gespalten und anschließend die Varianten mit 50 Basenpaaren Überhang zum Vektor und den *SfiI* Schnittstellen in *S. cerevisiae* transformiert. Durch *Gap Repair* konnte so in den Hefen die jeweilige Bibliothek hergestellt werden.

## 2.3. DNA Längenstandards und Protein-Molekulargewichtsmarker

### 2.3.1. DNA Längenstandards für Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Längenstandards wurden mit Aqua bidest und 6x *Loading Dye* auf eine DNA-Konzentration von 0,1 µg/µl eingestellt und dann bei 4 °C gelagert.

#### **Lambda DNA/*Eco47I* (*AvaII*) Marker, 13 (Fermentas)**

Der Marker enthält 36 definierte Fragmente. Hierfür wurde Lambda DNA vollständig mit *Eco47I* verdaut und gereinigt. Die einzelnen Fragmente haben folgende Längen in Basenpaaren: 8126, 6555, 6442, 3676, 2606, 2555, 2134, 2005, 1951, 1611, 1420, 1284, 985, 974, 894, 597, 590, 513, 511, 433, 398, 345, 310, 308, 272, 242, 215, 151, 88, 73, 67, 45, 42, 32, 29, 23.

#### **O'GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas)**

Der Marker enthält ein Gemisch aus 10 individuellen DNA-Fragmenten, die über Chromatografie gereinigt wurden und nachfolgende Fragmentlängen in Basenpaaren ergeben: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100.

#### **O'GeneRuler™ DNA Ladder, Ultra Low Range, ready-to-use (Fermentas)**

Der Marker enthält ein Gemisch aus 11 individuellen DNA-Fragmenten, die über Chromatografie gereinigt wurden und nachfolgende Fragmentlängen in Basenpaaren ergeben: 300, 200, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 20, 15, 10.

### 2.3.2. Molekulargewichtsmarker für Proteinelektrophorese

#### **Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)**

Der Marker ist ein Gemisch aus sieben verschiedenen gereinigten Proteinen. Dieser Marker dient der Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen, die mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt wurden. Zur Visualisierung der einzelnen Markerbanden erfolgt im Anschluss eine Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau. Die einzelnen Proteine haben folgende Molekulargewichte in Da: 116.000, 66.200, 45.000, 35.000, 25.000, 18.400, 14.400.

---

## 2.4. Oligodesoxyribonukleotide

### pCT Seq lo

5'-GCGCGCTAACGGAACGAAAAATAGAAA-3'

### pCT Seq up

5'-GTTCCAGACTACGCTCTGCAGGCT-3'

### MC slo ysc up

5'-GTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGCTAGCGCGGCCAGCCGGCCAT  
GGCG-3'

### McoTI Ysc2 lib lo

5'-ATCTCGAGCTATTACAAGTCCTCTTCAGAAATAAGCTTTTGTTCGGATCCGGCCCCCGAGGCCGAGCC  
GCA-3'

### CoTI VarII Libro

5'-CCTTCGCTGCCACCGGATCCGGCCCCCGAGGCCGAGCCGCAGTAACC-3'

### MCo NW Ala R8 up

5'-GCCCAGCCGGCCATGGCGATCGGTGTTTGCCCGAAGTTGCTGGCGGCATGCCGTGAGACTCC-3'

### MCo NW Ala K5 up

5'-GCCCAGCCGGCCATGGCGATCGGTGTTTGCCCGGCGTTGCTGCGCGCATGCCGT-3'

### FixIIB up

5'-GACTCCGATTGCCAGGTGCTTGCATCTGCCGTGGTAACGGTTACTGCGGCTCGGCCTCG-3'

### VarI up

5'-GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCGTCCXXXXXTGCYYYYXXXXXXXXXXXXXXXXXTGCZZZZ  
ZZGAC TCCGATTGCCAGG-3'

XXX = randomisiert mit 19 Aminosäuren außer Cystein

YYY = Originalcodon mit 10% Gemisch von 19 Aminosäuren außer Cystein

ZZZ = Originalcodon mit 50% Gemisch von 19 Aminosäuren außer Cystein

## 2.5. Antikörper, Enzyme, Proteine und Nukleinsäuren

Tabelle 2.1 Liste der verwendeten Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti- HA-Epitop Antikörper (monoklonal, Maus)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Anti- Maus Antikörper Biotin (polyklonal, Ziege)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Anti- Maus Antikörper FITC (polyklonal, Ziege)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Anti- Myc-Epitop Antikörper (monoklonal, Maus)	Abcam plc
Anti- Myc-Epitop Antikörper (monoklonal, Maus)	INVIGATE GmbH

Tabelle 2.2 Liste der verwendeten Enzyme, Proteine und Nukleinsäuren

Enzyme, Proteine und Nukleinsäuren	Hersteller
dNTPs	Carl Roth GmbH & Co KG
<i>Yeast Lytic Enzyme</i>	MP Biomedicals
Trypsin	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Thrombin	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Faktor Xa	Cellsystems Biotechnologie Vertrieb GmbH
Urokinase (uPA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, NEB
Taq Polymerase	MBI Fermentas
Taq Polymerase	AK Kolmar, TU Darmstadt
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Unstained Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas
O'GeneRuler™ DNA Ladder, Ultra Low Range	MBI Fermentas
O'GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	MBI Fermentas
Lambda DNA/Eco47I (AvaII) Marker, 13	MBI Fermentas
Oligodesoxyribonukleotide	Sigma Aldrich Chemie GmbH
randomisierte Oligodesoxyribonukleotide	Ella Biotech GmbH

## 2.6. Chemikalien

Tabelle 2.3 Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Aceton	Carl Roth GmbH & Co KG
Acetonitril HPLC Grade	Carl Roth GmbH & Co KG/BioSolve Group
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) Rotiphoese Gel 30	Carl Roth GmbH & Co KG
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co KG
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH & Co KG
Ameisensäure	Merck Chemicals KGaA
Ammoniumacetat	Carl Roth GmbH & Co KG
Ampicillin-Dinatriumsalz	Carl Roth GmbH & Co KG
Ammoniumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co KG
Acetanhydrid	Fluka Chemie GmbH
Ammoniumperoxodisulfat	Merck Chemicals KGaA

Anisol	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Brilliantblau R 250	Carl Roth GmbH & Co KG
Bromphenolblau	Merck Chemicals KGaA
Boc-Gln-Ala-Arg-pNA	Bachem
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH & Co KG
Chloroform	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Citronensäure	Carl Roth GmbH & Co KG
Casaminoacids	BD Biosciences
Collidin	Fluka Chemie GmbH
Dichlormethan	Sigma Aldrich Chemie/BioSolve Group
Dithiothreitol	Carl Roth GmbH & Co KG
Dimethylformamid	Sigma Aldrich Chemie/BioSolve Group
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Diisopropylethylamin	Sigma Aldrich Chemie/BioSolve Group
Dikaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG
Diethylether	Carl Roth GmbH & Co KG
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co KG
Ethidiumbromid	Gibco BRL
Ethylendiamintetraessigsäure	Applichem GmbH
Fmoc-Aminosäuren	CEM/Novabiochem/Iris Biotech
Glucose	Carl Roth GmbH & Co KG
Galactose	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co KG
Guanidin-HCl	Carl Roth GmbH & Co KG
Glutathion	Carl Roth GmbH & Co KG
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co KG
HEPES	Carl Roth GmbH & Co KG
Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co KG
HCl 37% rauchend	Carl Roth GmbH & Co KG
HATU	Novabiochem/Iris Biotech
HBTU	Novabiochem/Iris Biotech
HCTU	Novabiochem/Iris Biotech
HOBt	Novabiochem/Iris Biotech
Imidazol	Carl Roth GmbH & Co KG
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co KG
Isopropyl-s-D-thiogalactopyranosid	Carl Roth GmbH & Co KG
Kaliumcyanid	TU Darmstadt
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG
Kaliumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co KG
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH & Co KG
Lithiumacetat	Carl Roth GmbH & Co KG

Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG
Methylumbelliferon	Fluka Chemie GmbH
Methylumbelliferylguanidinobenzoat	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Methanol	Carl Roth GmbH & Co KG
Methyl <i>tert</i> - butylether	Carl Roth GmbH & Co KG/BioSolve Group
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH & Co KG
Nitrophenylguanidinobenzoat	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Natriumacetat	Acros Organics
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co KG
Nickelchlorid	Merck Chemicals KGaA
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co KG
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG
Ninhydrin	Carl Roth GmbH & Co KG
Natriumazid	Fluka Chemie GmbH
N-Methyl-2-pyrrolidon	Carl Roth GmbH & Co KG
Paraffinöl	Carl Roth GmbH & Co KG
Phenol	Carl Roth GmbH & Co KG
Piperidin	Carl Roth GmbH & Co KG/BioSolve Group
Pyridin	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Pepton	Carl Roth GmbH & Co KG
Stickstoff flüssig	TU Darmstadt
Streptavidin, R-Phycoerythrin Konjugat (SAPE)	Invitrogen GmbH
Streptomycin	Carl Roth GmbH & Co KG
Sucrose	Carl Roth GmbH & Co KG
Sorbitol	Carl Roth GmbH & Co KG
Sulfo-NHS-LC Biotin	Thermo Fisher Scientific
Spectrozyme tPA	American Diagnostica GmbH
Trypton	Carl Roth GmbH & Co KG
Tris-Acetate/HCl	Carl Roth GmbH & Co KG
TGR-Harz	Novabiochem
Tos-Gly-Pro-Arg AMC HCl	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Trifluoressigsäure	Carl Roth GmbH & Co KG/BioSolve Group
TEMED	Merck Chemicals KGaA
TWEEN 20	Carl Roth GmbH & Co KG
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co KG
Triethylsilan	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Xylencyanol	Carl Roth GmbH & Co KG
Yeast Nitrogen Base w/o	BD Biosciences
Z-Arg-7-AMC HCl	Bachem Holding AG

## 2.7. Sonstige Materialien und Geräte

Alle nicht explizit aufgeführten Geräte oder Materialien gehören zur Grundausstattung eines biochemischen Laboratoriums.

Tabelle 2.4 Liste der verwendeten Materialien und Geräte

Materialen und Geräte	Hersteller
Autoklav, Varioklav	Thermo Electron
Autoklav, HAST-4-5-6	Zirbus
Autoklav, V-150	System
Äkta Basic UV900 P900 Frac 900, Unicorn 3.1 Software	GE Healthcare
Basic Meter, pH-Meter	Sartorius
BioPhotometer	Eppendorf
Brutschrank	Heraeus
Brutschrank Incucell	MMM Med Center Einrichtungen GmbH
BioEdit v7.0.7	Ibis Biosciences
Benzamidin Sepharose fast flow	GE Healthcare
CertomatR BS-1 (Inkubationsschüttler)	Sartorius
<i>Dynabeads<sup>®</sup> Streptavidin Trial Kit</i>	Invitrogen
Elisa 96Well Platten, verschiedene	Thermo Fisher Scientific (Nunc)
Elektrophoresis Power Supply EPS 301 und 601	Amersham Pharmacia Biotech
Elektroporationsküvetten	BioRad
Elisareader, GENios <sup>™</sup>	Tecan Trading AG
EPICS Alignment Fluorespheres	Coulter Corporation
Eismaschine AF 100	Scotsman Ice Systems
Feinwaage, Sartorius UniversalU4800P	Sartorius
Feinwaage, AX 200	Shimadzu
Filtereinheiten Millex FG13	Millipore
<i>French Pressure Cell Press</i>	SLM Instruments
Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS), MoFlo <sup>®</sup> Cytometer mit Cyclone Sortiereinheit, Summit <sup>®</sup> v4.0 Software-Paket	Dako Cytomation, Fort Collins, USA
<i>Gene Pulser<sup>®</sup> und Pulse Controller</i>	BioRad
Geldokumentationskammer	Olaf Waase
GelDokumentationssystem, <i>Gel Jet Imager</i>	Intas
Gelgießkammer, Multiple Gel Caster	Hoefer Scientific
Glaswaren	Schott
Herafreezer, -80 °C Gefrierschrank	Heraeus
HPLC Säule Synergi 4u Hydro-RP 80 A; 250 x 4.60 mm)	Phenomenex
HPLC Säule YMC J'sphere ODS-H80,RP C-18 (250 x 20 mm, 4 µm, 8 nm)	YMC Europe GmbH
Hoefer <sup>™</sup> DualGel Caster	Amersham Biosciences
IMAC Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare

IMAC-Säulen	Qiagen GmbH
Kühlschrank	Liebherr/UniEquip GmbH
LC-MS 2020	Shimadzu
Microliterpipetten	Gilson/Eppendorf
Mikroskop Axioskop mit Durchlicht, Auflichtfluoreszenz (Filtersätze: 487902 und 487909) und Kameraaufsatz, Okulare: Vergrößerung 16x, Objektive: Plan Neofluar 40x/0,65 Oil; Plan Neofluar 100x/1,25 Oil; Acroplan 4x/0,1; Plan 100x/1,25 Oil	Zeiss
Magnetrührer	IKA-Labortechnik
Mikrowelle	Moulinex/ MTC-Medion
Operating Manual Freeze Dryer ALPHA 2-4 LSC	Krannich GmbH & Co KG
Objektträger (76x26 mm)	Carl Roth GmbH & Co KG
PyMol v0.99	DeLano Scientific LLC
Plasm 2.04	Biofreesoftware
Peptidsynthesizer Liberty/Discover SPS	CEM
PCR-Maschinen	Analytik Jena/Eppendorf/BioRad
Pipettierhilfe, Pipetus R -Akkus	Hirschmann Laborgeräte
PD-10 Säulen mit Sephadex™ G-25 Medium	GE Healthcare
Petrischalen, 92x16 mm und 150x20 mm	Sarstedt
Parafilm ® "M" Laboratory Film	American National Can.
PCR-Gefäße, Multiply R -µStrip 8er-Kette	Sarstedt
Polypropylenfilter	Roland Vetter Laborbedarf OHG
Q-Sepharose Fast flow	GE Healthcare
Quarzküvetten	Hellma
Reagiergefäß 1,5mL/2mL	Sarstedt AG
Röhrchen 15mL/50mL	Sarstedt AG
Röhrchen, 50 ml (für Zentrifugation bis 15.500 g)	Carl Roth GmbH & Co KG
Rotationsverdampfer Modell H	Büchi Labortechnik
Sigmaplot 11	Systat Software Inc
Schüttler, Titramax 1000	Heidolph Elektro GmbH & Co KG
Schüttler, Lab-Shaker/Lab-Therm	Adolf Kühner AG
Sonopuls HD 2070 (Ultraschallhomogenisator)	Bandelin Electronic GmbH & Co KG
Sterilbank, Envirco	CEAG Schirp Reinraumtechnik
Syringe Spritzen, 5 ml, 10 ml, 30 ml	Terumo, Leuven
Seals AirOtop	Biosilta
Taumelschüttler, Polymax 2040 und Duomax 1030	Heidolph Elektro GmbH & Co KG
Thermoblock	Olaf Waase
Thermomixer Compact	Eppendorf
Ultra Yield Flask	Biosilta
Ultrafree-20 Nanopore-Wasser-Anlage	Millipore
UV-Küvetten, Halb-Mikro 10 mm	Brand/ Sarstedt AG
UVT2035 302 nm UV-Leuchttisch	Herolab



Varian modular system comprising a PrepStar 218 Solvent Delivery Module, a ProStar 410 HPLC AutoSampler and a ProStar 325 Dual Wavelength UV-Vis HPLC detector	Varian
Varian 920-LC Analytical HPLC system	Varian
Vakuum Pumpe, Ilmvac Typ 109012	Ilmvac GmbH
Vortex ® Genie 2	Bender & Hobein
Waage, PM 4600,	Mettler-Waagen GmbH
Waage, Universal	Sartorius
Wasseraufbereitungsanlage, MilliQ-Synthesis A10	Millipore
Zentrifuge, (Mikrotiterplatten) 5804R	Eppendorf
Zentrifuge, (Kühlzentrifuge) Multifuge 3 L-R	Eppendorf
Zentrifuge, (Kühlzentrifuge) Eppendorf 5415 R	Eppendorf
Zentrifuge, (Kühlzentrifuge) Sigma 3K30	Sigma Laborzentrifugen GmbH
Zentrifuge, (Kühlzentrifuge) Sigma 6K15	Sigma Laborzentrifugen GmbH
Zentrifuge, (Tisch)	Hettich
Zweistrahl-Spektralphotometer UV-1650-PC mit UVProbe v 2.20 Software Paket	Shimadzu
ZelluTrans Dialysiermembranen	Carl Roth GmbH & Co KG

## 2.8. Nährmedien

*Escherichia coli*

### **dYT Medium**

1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1,6 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) NaCl

### **LB Medium**

0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl

### **TB Medium**

2,4 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1,2 % (w/v) Trypton, 0,4 % (v/v) Glycerin in 900 mL Wasser.

0,17 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,72 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  in 100 mL Wasser.

Die Nährmedien wurden zur Sterilisation 20 min bei 120 °C autoklaviert. Für feste Medien wurde vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugegeben. Antibiotika wurden aus den entsprechenden 1000fach konzentrierten Stammlösungen bis zu einer Endkonzentration von 25 mg/L Chloramphenicol, 100 mg/L Ampicillin bzw. 75 mg/L Kanamycin zugegeben.

*Saccharomyces cerevisiae*

### **YPD Medium**

1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 2 % (w/v) Trypton, 2% (w/v) Glucose

### **SDCAA Medium**

2 % (w/v) Glucose, 0,67 % (w/v) Yeast Nitrogen Base, 0,5 % (w/v) Casamino Acids,  
38 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 62 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  [pH 7,4]

oder

20 mM Citronensäure  $\cdot \text{H}_2\text{O}$ , 57 mM Natriumcitrat [pH 4,5]

### **Low-SDCAA Medium**

0,5 % (w/v) Glucose, 0,67 % (w/v) Yeast Nitrogen Base, 0,5 % (w/v) Casamino Acids,  
38 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 62 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  [pH 7,4]

oder

20 mM Citronensäure  $\cdot \text{H}_2\text{O}$ , 57 mM Natriumcitrat [pH 4,5]

### **SGCAA Medium**

2 % (w/v) Galactose, 0,67 % (w/v) Yeast Nitrogen Base, 0,5 % (w/v) Casamino Acids,  
38 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 62 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  [pH 7,4]

oder

20 mM Citronensäure  $\cdot \text{H}_2\text{O}$ , 57 mM Natriumcitrat [pH 4,5]

### **SDCAA Platten**

2 % (w/v) Galactose, 0,67 % (w/v) Yeast Nitrogen Base, 0,5 % (w/v) Casamino Acids,  
38 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 62 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1 M Sorbitol, 1,5% (w/v) Agar

Die Nährmedien wurden zur Sterilisation 20 min bei 120 °C autoklaviert. Glucose, Galactose, sowie Yeast Nitrogen Base und Casamino Acids wurden separat autoklaviert oder sterilfiltriert. Antibiotika wurden aus den entsprechenden 100fach konzentrierten Stammlösungen bis zu einer Endkonzentration von 60 mg/L Ampicillin und 100 mg/L Streptomycin zugegeben.

## 2.9. Lösungen und Puffer

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit demineralisiertem Wasser (Millipore, Nanopore-Wasser-Anlage) angesetzt. Bei den verwendeten Kits Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System, Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up-System, PureYield® Plasmid Midiprep System der Firma Promega® wurden die mitgelieferten Puffer verwendet, welche den Herstellerangaben entsprachen.

Tabelle 2.5 Liste der während dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer.

Lösungen und Puffer	Menge
<b>Ammoniumacetat-Stammlösung</b>	
NH <sub>4</sub> Ac	7 M
<b>Acetatpuffer</b>	
NaOAc pH 4,5	20 mM
<b>APS-Stammlösung</b>	
APS	10 % (w/v)
<b>Ampicillin-Stammlösung</b>	
Ampicillin (Na-Salz) sterilfiltriert	100 mg/mL
<b>Amp-Strep Stammlösung</b>	
Ampicillin	6 mg/mL
Streptomycin	10 mg/mL
<b>Benzamidinpuffer</b>	
Tris-HCl (pH 8)	50mM
KCl	100 mM
Benzamidin	20 mM
<b>Chloramphenicol-Stammlösung</b>	
Chloramphenicol In 96 % Ethanol	25 mg/mL
<b>Coomassie-Färbelosung für SDS-PAGE</b>	
Brilliantblau R-250 in Methanol	0,2 % (w/v)
Essigsäure	20 % (v/v)
Beide Lösungen kurz vor Gebrauch 1:1 mischen	
<b>dNTP-Lösung für PCR</b>	
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Je 2,5 mM
<b>DNA Loading Dye (6x)</b>	
Tris-HCl, (pH 7,6)	10 mM
Bromphenolblau	0,03 % (w/v)
Xylencyanol	0,03 % (w/v)
Glycerin	60 % (v/v)
EDTA	60 mM
<b>Ethidiumbromid-Stammlösung</b>	

Ethidiumbromid	10 mg/mL
<b>E-Puffer nach Chao</b>	
Tris (pH 7,5)	10 mM
Sucrose	270 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
<b>E-Puffer nach Benatuil</b>	
Sorbitol	1 M
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
<b>EDTA Lösung</b>	
EDTA	500 mM
<b>Hoechst-Puffer</b>	
Harnstoff	8 M
TRIS-Base	200 mM
DTT	200 mM
SDS	2 % (w/v)
Bromphenolblau	0,15 mM
<b>HEPES-Puffer</b>	
HEPES (pH 7,2)	50mM
NaCl	50mM
BSA	0,05%
DTT	1mM
<b>IPTG-Stammlösung</b>	
IPTG sterilfiltrieren und Lagerung bei -20 °C	1 M
<b>Kanamycin-Stammlösung</b>	
Kanamycin sterilfiltriert	75 mg/mL
<b>Kaisertest Lösung 1</b>	
Ninhydrin	5 g
Ethanol	100 mL
<b>Kaisertest Lösung 2</b>	
Phenol	80 g
Ethanol	20 mL
<b>Kaisertest Lösung 3</b>	
KCN (1mM)	2 mL
Pyridin	98 mL
<b>Lithium DTT Puffer sterilfiltriert</b>	
Lithiumacetat	100 mM
1,4-Dithiothreitol	10 mM
<b>Laemmli-Puffer für SDS-Page (10x)</b>	
Tris-HCl	250 mM
Glycin	2 M
SDS	1 % (w/v)

<b>Matriptase Harnstoffpuffer</b>	
Harnstoff	6 M
Tris-HCl, (pH 8)	50 mM
NaCl	100 mM
Mercaptoethanol	1 mM
<b>Matriptase Elutionspuffer</b>	
Imidazol	500 mM
Tris-HCl (pH 8)	50 mM
NaCl	100 mM
Mercaptoethanol	1 mM
Harnstoff	4,5 M
<b>Matriptase Resuspendierungspuffer</b>	
Tris-HCl, (pH 8)	50 mM
KCl	500 mM
Glycerin	10% (v/v)
Mercaptoethanol	1 mM
<b>Matriptase Rückfaltungspuffer I</b>	
Tris-HCl, (pH 8)	50 mM
Glycerin	10 % (v/v)
KCl	100 mM
Mercaptoethanol	1 mM
Harnstoff	3 M
<b>Matriptase Rückfaltungspuffer II</b>	
Tris-HCl, (pH 8)	50 mM
Glycerin	10 % (v/v)
KCl	100 mM
Mercaptoethanol	1 mM
<b>Miniprotein Rückfaltungspuffer 1</b>	
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , (pH 9.1)	0.2 M
<b>Miniprotein Rückfaltungspuffer 2</b>	
Guanidin-HCl (pH 7)	1 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM
DMSO	15 % (v/v)
Trifluoressigsäure	15 % (v/v)
<b>Nickel Lösung</b>	
Nickelchlorid	100 mM
<b>Phosphate buffered saline (PBS)</b>	
NaCl	140 mM
KCl	10 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,4 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM
<b>PBSF</b>	
PBS mit BSA	0,1 %

<b>PBST</b>	
PBS mit Tween 20	0,05% (v/v)
<b>Reaktionspuffer für Reaktionsendonukleasen</b>	<b>(MBI Fermentas)</b>
<b>Gelb</b>	
Tris-Acetat, (pH7,9)	33 mM
Magnesiumacetat	10 mM
Kaliumacetat	66 mM
<b>Grün</b>	
Tris-HCl, (pH 7,5)	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
NaCl	50 mM
<b>Salzpuffer</b>	
Tris-HCl (pH 8)	50 mM
NaCl	1M
<b>SDS-Stammlösung</b>	
SDS	10 % (w/v)
<b>S-Puffer autoklaviert</b>	
Sorbitol,	1 M
PIPES (pH 6,5)	10 mM
Xylencyanol FF	0,1 % (w/v)
<b>Schägger Kathodenpuffer</b>	
Tris-HCl	0,1 M
Tricin	0,1 M
SDS	0,1 %
<b>Schägger Gelpuffer</b>	
Tris-HCl, (pH 8,45)	3 M
SDS	0,3 %
<b>Schägger Anodenpuffer</b>	
Tris-HCl (pH 8,9)	0,2 M
<b>Sammelgel-Puffer nach Laemmli</b>	
Tris-HCl, (pH 6,8)	1,25 M
<b>Trenngel-Puffer nach Laemmli</b>	
Tris-HCl, (pH 8,0)	1,875 M
<b>Trypsinassaypuffer</b>	
Tris-HCl (pH 7,6)	50 mM
NaCl	150 mM
Triton X-100	0,01 %
NaN <sub>3</sub>	0,01 %
<b>Taq 10x Puffer (Hausmarke)</b>	
Tris-HCl, (pH 8,8)	100 mM

KCl	500 mM
MgCl <sub>2</sub>	25 mM
Triton X-100	1 % (v/v)
<b>Taq 10x Puffer (MBI Fermentas)</b>	
Tris-HCl, (pH 8,8)	100 mM
KCl	500 mM
Nonidet P40	0,8% (v/v)
<b>Tris-DTT Puffer sterilfiltriert</b>	
1,4-Dithiothreitol	2,5 M
Tris-HCl, (pH 8)	1 M
<b>TAE Puffer (50x)</b>	
Tris-Acetat	2 M
EDTA	50 mM
<b>TE-Puffer</b>	
Tris-HCl, (pH 8,0)	10 mM
EDTA	0,5 mM
<b>Yeast Lytic Enzyme Lösung</b>	
Yeast Lytic Enzyme in S-Puffer	2mg/mL

## 2.10. Kits

Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)

Wizard<sup>®</sup> Plus SV Midipreps DNA Purification System (Promega)

Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

---

### 3. Methoden

---

#### 3.1. Mikrobiologische Methoden

##### 3.1.1. Vorbereiten von Geräten und Lösungen

Hitzestabile Geräte wurden durch Erhitzen für 20 min auf 181 °C sterilisiert. Hitzestabile Lösungen wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. In der Hitze nicht beständige Geräte wurden mit 70 % (v/v) Ethanol gereinigt und getrocknet. Hitzelabile Bestandteile von Lösungen wurden als konzentrierte Stammlösungen hergestellt und vor der Zugabe zu bereits sterilen Lösungen durch einen Membranfilter der Porengröße von 0,2 µm steril filtriert.

##### 3.1.2. Stammhaltung und Kultivierung von *Escherichia coli*

Die verwendeten Bakterienstämme von *Escherichia coli* wurden zur längerfristigen Aufbewahrung entweder mit 10 % (v/v) DMSO versetzt und bei -80 °C oder als Glycerinkulturen gelagert. Dazu wurde 1 mL Glycerin mit 1 ml einer Übernachtskultur des betreffenden Bakterienstammes vermischt. Häufig verwendete Bakterienstämme wurden auf Selektivplatten ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C angezogen und konnten so bei 4°C für einige Wochen aufbewahrt werden.

Zur Kultivierung wurden die *Escherichia coli* Stämme bei 37 °C und 180 U/min in dYT-Medium vermehrt. Im Falle plasmidcodierter Resistenzen wurden die Medien mit den entsprechenden Antibiotika komplettiert. Bis zu einem Volumen von 5 mL wurden die Bakterien in Röhrchen angezogen. Kulturen mit einem Volumen von 50 mL wurden in Erlenmeyerkolben vermehrt.

##### 3.1.3. Stammhaltung und Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die verwendeten Hefestämme von *Saccharomyces cerevisiae* wurden zur längerfristigen Aufbewahrung mit 15 % (v/v) Glycerin oder 2 % (v/v) Glycerin und 0,67 % Yeast Nitrogen Base versetzt und bei -80°C gelagert.

Zur kurzfristigen Lagerung wurden die *Saccharomyces cerevisiae* Stämme auf YPD/SDCAA Agarplatten ausgestrichen oder in YPD/SDCAA Medien bei 4 °C aufbewahrt und waren so für einige Wochen verwendbar.

Die Anzucht erfolgte bei 30 °C und 200 U/min in YPD/SDCAA Medium bis zu einem Volumen von 5 mL in Röhrchen. Kulturen mit einem Volumen von 50 bis 1000 mL wurden in Ultra Yield Flasks angezogen.

##### 3.1.4. Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte der Kulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) im Spektralphotometer bestimmt. Als Leerwert wurde unbeimpftes Medium verwendet. Die Kulturen wurden gegebenenfalls so verdünnt, dass die OD<sub>600</sub> kleiner als eins war. Die tatsächliche Dichte wurde dann aus dem gemessenen Wert errechnet.



### 3.1.5. Transformation von *Escherichia coli*

Zur Transformation von *Escherichia coli* wurde standardmäßig nach folgender Elektroporationsmethode verfahren.<sup>[214]</sup>

Zur einfachen Plasmid Vermehrung wurden 50 mL dYT mit dem entsprechenden Stamm von *Escherichia coli* von der Selektivplatte inokuliert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 herangezogen. Die Zellen wurden zentrifugiert (4000 U/min, 12 min, 4 °C), in 30 mL eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimalig wiederholt, wobei beim zweiten Mal in 20 mL, beim dritten Mal in 10 mL eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert wurde. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgegossen und das Zellpellet in 300-500 µL Wasser resuspendiert. Während der gesamten Prozedur wurden die Zellen auf Eis gehalten. Zur Transformation wurden 50-100 µL Zellsuspension mit 1-5 µL Plasmid-DNA versetzt und in eine gewaschene und vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte nach 5 minütiger Inkubation des Zell/DNA-Gemisches auf Eis bei folgenden Einstellungen:

200 mA Stromstärke, 2,5 kV Spannung, 6250 V/cm Feldstärke, 5 s Impuls, 4,0 - 4,5 ms Zeitkonstante und Raumtemperatur. Unmittelbar nach dem Spannungspuls wurde 1 mL dYT-Medium in die Elektroporationsküvette pipettiert, der Inhalt in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und die Zellsuspension für eine Stunde bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde die Kultur auf Selektivplatten ausgestrichen bzw. 50 mL selektives dYT-Medium mit der Kultur beimpft.

### 3.1.6. Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Transformation von Hefezellen wurde auf zwei Arten durchgeführt. Nach Chao et al<sup>[215]</sup> werden die EBY100 Zellen in 50 mL YPD bis zu einer OD<sub>600</sub> 1,5 kultiviert und anschließend 15 Minuten mit 500 µL Tris-DTT Puffer bei 30 °C im Schüttler inkubiert. Die Zellen werden zentrifugiert (3 min, 3000 U/min, 4°C) und mit 25 mL und 1 mL eiskaltem E-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wird in einem Gesamtvolumen von 300 µL E-Puffer resuspendiert und die so kompetenten Zellen bis zur Transformation auf Eis gelagert. Zur Transformation wurden 50-100 µL Zellsuspension mit 1 µg geschnittener Plasmid-DNA und 5-10 µg Insert-DNA versetzt und in eine gewaschene und vorgekühlte 2 mm Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte nach 5 minütiger Inkubation des Zell/DNA-Gemisches auf Eis bei 540 Volt, 25 µF und Raumtemperatur. Unmittelbar nach dem Spannungspuls wurde 1 mL 30 °C warmes YPD-Medium in die Elektroporationsküvette pipettiert, der Inhalt in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und für eine Stunde bei 30 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 3000 U/min), in 10-100 mL SDCAA Medium resuspendiert und für 48 Stunden bei 30 °C kultiviert. Es wurden auch Verdünnungsplattierungen der transformierten Zellen auf Selektivplatten ausgestrichen um die Transformationseffizienz festzustellen.

Die Transformationsmethode nach Benatuil et al.<sup>[211]</sup> ist eine optimierte Variante der vorhergehenden Methode. Dabei werden EBY100 Zellen in 100 mL YPD Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> 1,5 kultiviert und anschließend zentrifugiert (3 min, 3000 U/min, 4°C). Die Zellen werden zweimal mit 50 mL eiskaltem, sterilem Wasser und einmal mit 50 mL eiskaltem E-Puffer gewaschen. Danach werden die Zellen in 20 mL Lithium-DTT Puffer resuspendiert und 30 Minuten bei 30 °C geschüttelt. Anschließend wird wieder mit 50 mL eiskaltem E-Puffer gewaschen und die Zellen in einem Gesamtvolumen von 1 mL in E-Puffer resuspendiert und bis zur Transformation auf Eis gelagert. Zur Transformation wurden 400 µL Zellsuspension mit 4 µg geschnittener Plasmid-DNA und 12 µg Insert-DNA versetzt und in eine gewaschene und vorgekühlte 2 mm Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte nach 5 minütiger Inkubation des Zell/DNA-Gemisches auf Eis bei 2500 Volt, 25 µF und Raumtemperatur. Unmittelbar nach dem Spannungspuls werden die Zellen in 8 mL einer 1:1 Mischung aus 1M Sorbitol und YPD Medium überführt und für eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 3000 U/min), in 250 mL SDCAA Medium pro Küvette resuspendiert und für 48 Stunden bei 30 °C kultiviert. Es wurden auch Verdünnungsplattierungen der transformierten Zellen auf Selektivplatten ausgestrichen um die Transformationseffizienz festzustellen.

### **3.1.7. Expression von MT-SP1 in *Escherichia coli***

*E.coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP Zellen die zuvor mit dem Plasmid pET42dest His-Matriptase 596\_855 transformiert worden sind, werden über Nacht in dYT Medium kultiviert. Die Produktion von Matriptase erfolgt als *Inclusion bodies* in 1 L TB-Medium. Zum Anfang wird die OD<sub>600</sub> 0,1 eingestellt, die entsprechenden Antibiotika hinzugefügt und bei 37 °C und 180 U/min kultiviert bis eine OD<sub>600</sub> 0,5 erreicht ist. Die Induktion erfolgt mit 1 mL 1 M IPTG. Die Produktion der Proteine wird 4h bei 37 °C durchgeführt. Anschließend werden die Zellen sedimentiert (4000 U/min, 30 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wird in Matriptase Resuspendierungspuffer (5mL/g) aufgenommen und bis zum Aufschluss mittels Sonifikation oder *French Press* bei -80°C gelagert.

### **3.1.8. Oberflächenpräsentation von Miniproteinen auf *Saccharomyces cerevisiae***

Zur Induktion der Oberflächenpräsentation wird die entsprechende in SDCAA angezogene Menge an Hefezellen zentrifugiert und in SGCAA mit einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 - 1 resuspendiert. Bei einem Volumen von 5 mL wurde in Röhrchen kultiviert. Kulturen mit einem Volumen von 10 bis 100 mL wurden in Ultra Yield Flasks kultiviert. Die Dauer kann zwischen 18 Stunden für Einzelklone und 60 Stunden für Bibliotheken zur optimalen Induktion der Zellen betragen, ebenso kann die Temperatur zwischen 20°C und 37°C liegen. Beide Parameter müssen durch entsprechende Experimente für die jeweiligen Bedingungen herausgefunden werden.

## 3.2. Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1. Fällung von DNA mit Ammoniumacetat und Ethanol

Die Ethanol Fällung diente der Konzentration von DNA und der Entfernung von Proteinen, Salzen und freien Nukleotiden. Proteine und Salze wurden zwar nicht vollständig, für viele Zwecke jedoch in ausreichendem Maße entfernt. Dabei wurde die Konzentration monovalenter Kationen erhöht, was durch Erhöhung der Dielektrizitätskonstante die Abstoßung des negativ geladenen Phosphodiester-Rückgrats verminderte, wodurch bei Lösungsmittelentzug durch Zugabe von Ethanol die DNA-Fällung ermöglicht wurde.

Die DNA-haltige Lösung wurde mit 1/10 Volumen 7 M Ammoniumacetatlösung und 3 Volumen 98 % Ethanol versetzt, eine Stunde bei -20 °C gefällt und danach zentrifugiert (13.000 U/min, 30 min, 4°C). Das Pellet wurde einmalig mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und 10 min bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde dann vorsichtig mit der Pipette abgenommen und das DNA-Pellet bei 37 °C auf dem Heizblock getrocknet, um Ethanolreste quantitativ zu entfernen. Anschließend wurde die DNA in dem gewünschten Volumen TE-Puffer aufgenommen.

### 3.2.2. Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA Fragmenten, wurde die Methode der Agarosegelelektrophorese verwendet. Die Auftrennung von doppelsträngiger DNA wurde in Agarosegelen der Konzentration von 1-2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer durchgeführt. Durch Aufkochen wurde die Agarose vollständig in dem eingesetzten Puffer aufgelöst und bei 64 °C bis zur Verwendung gelagert. Zum Anfärben der DNA wurde 0,5 µg/mL Ethidiumbromid zugesetzt. Das Gel wurde in einen abgegrenzten Bereich der Gelelektrophoresekammer gegossen und ein Taschenkamm der gewünschten Größe aufgesetzt. Nach Erhärten des Gels wurde der Taschenkamm entfernt und das Gel mit TAE-Puffer überschichtet, bis das Gel und die Elektroden vollständig von Puffer bedeckt waren. Die Proben wurden mit mindestens 1/5 Volumen Äquivalent *DNA Loading Dye* versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung zwischen 40 V und 130 V für 30 - 60 min durchgeführt. Zur Detektion der DNA Fragmente im Agarosegel, wurde das Gel in den Gel Jet Imager überführt und mit UV Durchlicht (302 nm) das eingelagerte Ethidiumbromid zur Fluoreszenz angeregt und fotografiert bzw. definierte Banden mit dem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Längen- und Konzentrationsbestimmung für die resultierenden DNA-Banden wurden Fragmentlängenstandards (DNA-Konzentration: 100 ng/µL) verwendet.

### 3.2.3. Bestimmung der DNA Konzentration

Die Konzentration an Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen kann durch Messung der Absorption bei 260 nm nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ermittelt werden. Die Messung erfolgte hierbei in einer Quarzküvette mit der Schichtdicke 1 cm. Eine OD<sub>260</sub> 1 entspricht hierbei einer Konzentration von 50 µg/mL dsDNA, 35 µg/mL RNA bzw. 33 µg/mL ssDNA. Durch eine zusätzliche Messung bei 280 nm kann das Maß an Verunreinigung durch Proteine ermittelt werden. Dabei wird der Quotient der beiden Messungen OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> ermittelt. Ein Wert von 2 entspricht einer proteinfreien Lösung.

### **3.2.4. Extraktion von DNA aus Agarosegelen und PCR Ansätzen mittels Wizard® SV Gel und PCR Clean-Up System Kit (Promega)**

Zur Isolierung der zuvor über Gelelektrophorese aufgetrennten und ausgeschnittenen DNA oder von PCR Ansätzen, wurde das Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kit der Fa. Promega verwendet. Die Extraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **3.2.5. Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli***

#### **3.2.5.1. Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Mini-Präparation) mit dem Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System-Kit (Promega)**

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* in analytischen Mengen erfolgt mittels des Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System der Fa. Promega. Es funktioniert auf Basis der alkalischen Lyse von Bakterienzellen. Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **3.2.5.2. Isolierung von Plasmid-DNA in präparativen Mengen (Midi-Präparation) mit dem Pure Yield® Plasmid Midiprep System-Kit (Promega)**

Um Plasmid-DNA im präparativen Maßstab zu isolieren wurde das Pure Yield® Plasmid Midiprep System der Fa. Promega verwendet. Das System funktioniert auf Basis der alkalischen Lyse von Bakterienzellen. Dazu wurden 50 mL einer Übernachtskultur von *Escherichia coli* sedimentiert und der Überstand verworfen. Die weitere Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **3.2.6. Isolierung von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae***

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte mittels Zellwandverdau mit *Yeast Lytic Enzyme* und anschließendem Aufschluss der Spheroblasten durch das Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System der Fa. Promega.

Dazu wurden 4 mL einer Übernachtskultur zentrifugiert (1 min, 13000 U/min) und die Zellen in 400 µL TE-Puffer resuspendiert. Es wurden 600 µL Wasser und 5 µL β-Mercaptoethanol hinzugegeben und inkubiert (1 h, 30 °C, 400 U/min). Im Anschluss wurden die Zellen sedimentiert (1 min, 13000 U/min), der Überstand verworfen und mit 400 µL S-Puffer gewaschen. Es wurde erneut zentrifugiert und die Zellen in 400 µL S-Puffer resuspendiert, 20 µL YLE Lösung zugegeben und inkubiert (1 h, 30 °C, 400 U/min). Die so entstandenen Spheroblasten wurden sedimentiert (1 min, 13000 U/min) und der Überstand entfernt. Anschließend wurde die Plasmid DNA mit dem Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System nach Herstellerangaben extrahiert. Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.3. Enzymatische Manipulation von DNA

#### 3.3.1. Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen unter den vom jeweiligen Hersteller des Enzyms empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen verdaut. Simultane Spaltungen mit mehreren Enzymen wurden unter den Pufferbedingungen durchgeführt, bei denen die Enzyme laut Hersteller mindestens 50 % Aktivität aufwiesen. War ein Mehrfachverdau aufgrund abweichender Pufferanforderungen nicht möglich, wurden die Verdaue nacheinander unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Die DNA wurde in der Regel in einer Endkonzentration des Spaltungsansatzes von 100 ng/ $\mu$ L mit 1 - 2 Einheiten Enzym pro Mikrogramm DNA für 2 h inkubiert.

#### 3.3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion steht eine potente in vitro Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente zur Verfügung.<sup>[216-218]</sup> Mit ihr ist es möglich, aus einem komplexen DNA-Gemisch heraus selektiv eine DNA-Matrize zu vervielfachen. Eine PCR Reaktion besteht im Wesentlichen aus 3 Schritten. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA-Matrize durch Erhitzen (94 °C) in eine einzelsträngige DNA denaturiert (*denaturation*). Anschließend wird das Reaktionsgemisch bis zu einer definierten Temperatur abgekühlt (52 °C), hierbei hybridisieren die Oligonukleotide an die Matrizen-DNA (*Annealing*). Die Oligonukleotide besitzen am 3'-Ende eine freie Hydroxylgruppe, welche benötigt wird, damit die Polymerase sich anlagern kann. Im letzten Schritt wird die Reaktionsmischung erhitzt (72 °C), das Temperaturoptimum der thermostabilen Polymerase, welche nun die *Primer* komplementär zur ursprünglichen Duplex DNA verlängert (*Elongation*). Dieser Vorgang, ein Amplifikationszyklus, wird nun mehrfach wiederholt um den von den *Primern* flankierten DNA Abschnitt zu amplifizieren.

Tabelle 3.1 Standardansatz für eine PCR Reaktion

Substanz	Konzentration/Menge	Volumen
Taq 10x Puffer		5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 $\mu$ L
Templat DNA	5-20 ng	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O		37 $\mu$ L
dNTP's	10mM	1 $\mu$ L
Oligo up	10 pmol	1 $\mu$ L
Oligo low	10 pmol	1 $\mu$ L
Taq Polymerase	1 Unit	1 $\mu$ L

Für die durchgeführten PCR Reaktionen wurde ein Standardansatz mit 50  $\mu$ L Gesamtvolumen durchgeführt [Tab 3.1]. Die Reaktionsgefäße wurden mit einem Tropfen Paraffinöl überschichtet um einem Evaporation während der PCR Reaktion vorzubeugen. Die Länge und die Temperatur der einzelnen Reaktionsschritte der PCR-Zyklen, sowie deren Anzahl wurde durch die Wahl der Matrize, die Basenzusammensetzung und Länge der Primer, sowie durch die Länge der zu amplifizierenden Sequenz bestimmt. Die Denaturierung der Matrizen-DNA zu Beginn der PCR erfolgte bei 96 °C für 2 Minuten. Die zyklische Denaturierung 30 s bei 94 °C. Die Elongationsreaktion wurde bei 72 °C für 60s pro 1000 Basenpaare durchgeführt. Die Anzahl der Zyklen betrug zwischen 30 und 35.

Die optimale Annealingtemperatur für die jeweilige PCR-Reaktion wurde mit einer Gradienten-PCR bei verschiedenen Temperaturen zwischen 45 und 65 °C herausgefunden. Oder mit Formel (1) abgeschätzt:

$$T_A = \frac{(T_{M1} + T_{M2})}{2} - 3^\circ\text{C} \quad (1)$$

$T_{M1}$  und  $T_{M2}$  stehen dabei für die Schmelztemperaturen der beiden verwendeten *Primer*. Die Schmelztemperatur  $T_M$  eines Oligonukleotids konnte nach der empirischen Formel (2) berechnet werden, welche sowohl den relativen G/C-Gehalt (% G/C) als auch die Länge der Oligonukleotide (n) mit einbezieht:

$$T_M [^\circ\text{C}] = 69,3 + 0,41 \cdot (\% \text{ G/C}) - \frac{650}{n} \quad (2)$$

Nachdem letzten Zyklus wurde eine abschließende Elongation für 2 min bei 72 °C durchgeführt, um nicht vollständig elongierte DNA-Fragmente aufzufüllen.

### 3.3.3. Kolonie PCR von *Escherichia coli*

Die Kolonie PCR ermöglicht die Durchmusterung von Bakterien- und Hefezellen zur Überprüfung ob diese das gewünschte DNA Fragment beinhalten. Dazu werden bei Bakterien die Einzelklone in einem verlängerten Denaturierungsschritt erhitzt, die enthaltenen Proteine denaturiert und die enthaltene DNA freigesetzt. Anschließend wird die DNA mit einer PCR-Reaktion amplifiziert und mittels Agarosegelelektrophorese überprüft, ob die PCR Reaktion erfolgreich war. Im Unterschied zu einer normalen PCR Reaktion wurde die Polymerase erst nach dem Denaturierungsschritt hinzugegeben.

Mit einer Pipettenspitze wurden die Bakterienkulturen von den Selektivplatten gepickt und nach überimpfen auf eine Agarplatte in das Reaktionsgefäß, gefüllt mit dem PCR Ansatz ohne Polymerase, überführt. Diese Lösung wurde erhitzt (2 min, 98 °C) und nach Ablauf dieser Zeit die Taq Polymerase zugegeben. Dieses Reaktionsgemisch wurde einem üblichen PCR Programm unterzogen. Die Oligodesoxyribonucleotide wurden so gewählt, dass einer sich auf dem gewünschten Insert und einer auf dem Plasmid anlagerte um Fehler auszuschließen.

### 3.3.4. Kolonie PCR von *Saccharomyces cerevisiae*

Bei der Kolonie PCR von Hefezellen werden die Einzelklone mit *Yeast Lytic Enzyme* aufgeschlossen und anschließend in einem verlängerten Denaturierungsschritt erhitzt. Dadurch werden die enthaltenen Proteine denaturiert und die enthaltene DNA freigesetzt. Anschließend wird die DNA mit einer PCR-Reaktion amplifiziert und mittels Agarosegelelektrophorese überprüft, ob die PCR Reaktion erfolgreich war. Im Unterschied zu einer normalen PCR Reaktion wurde die Polymerase erst nach dem Denaturierungsschritt hinzugegeben.

Mit einer Pipettenspitze wurden die Hefekclone von den Selektivplatten gepickt und nach überimpfen auf eine SDCAA-Platte in das Reaktionsgefäß, gefüllt mit dem 20 µL S-Puffer und 2 µL *Yeast Lytic Enzyme* Lösung überführt und inkubiert (2 h, 30°C). Nach der Inkubation und Denaturierung (2 min 98 °C) werden 10 µL dieser Lösung in einen Standard PCR Ansatz gegeben und einem üblichen PCR Programm unterzogen. Die Oligodesoxyribonucleotide wurden so gewählt, dass sich eines auf dem Insert und eines auf dem Plasmid anlagerten.

### 3.4. Proteinchemische Methoden

#### 3.4.1. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen, wird unter denaturierenden Bedingungen eine Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) durchgeführt.<sup>[219, 220]</sup> Als Detergenz wird Natriumdodecylsulfat (SDS) verwendet, das die nichtkovalenten Bindungen der Proteine unterbricht und somit ihre Sekundär- und Tertiärstruktur zum Teil zerstört.

Die Polyacrylamidgele wurden in einer Gelgießkammer hergestellt, in der zeitgleich 5 - 10 Gele gegossen werden konnten. Die Herstellung der Sammel- und Trenngele erfolgte nach folgender Zusammensetzung [Tab 3.2]. Nach vollständiger Polymerisation der Acrylamidgele, wurden diese aus der Gießkammer entfernt und in mit Wasser angefeuchteten Tüchern einzeln eingewickelt und zusammen in einem Autoklavierbeutel bei 4 °C gelagert.

Tabelle 3.2 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel nach Laemmli.<sup>[220]</sup> Angaben für 5 Gele.

Lösung	Trenngel	Sammelgel
Rotiphorese <sup>R</sup> Gel 30 (37,5:1)	16,8 mL	2,8 mL
Trenngelpuffer	8 mL	---
Sammelgelpuffer	---	5,2 mL
H <sub>2</sub> O	6,8 mL	8 mL
75% Glycerin	8 mL	4 mL
10% SDS	400 µL	200 µL
10% APS	160 µL	160 µL
TEMED	40 µL	40 µL

Tabelle 3.3 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel nach Schägger (Tris-Tricin Gele).<sup>[219]</sup> Angaben für 5 Gele.

Lösung	Trenngel	Sammelgel
Rotiphorese <sup>R</sup> Gel 30 (37,5:1)	20 mL	1,6 mL
Gelpuffer nach Schägger	10 mL	3,1 mL
H <sub>2</sub> O	---	7,6 mL
10% APS	160 µL	160 µL
TEMED	40 µL	40 µL

Die Polyacrylamidgele wurden in an der Laufkammer befestigt und die Kammer mit dem entsprechenden Puffer gefüllt. Zur Probenvorbereitung wurden die aufzutrennenden Lösungen mit 1/4 Volumen *Hoechst*-Puffer versetzt, erhitzt (10 min, 98 °C), anschließend zentrifugiert (1 min, 13000 U/min) und in die Probenkammer pipettiert. Die Elektrophorese wurde bis zum Durchlauf der Farbmarkerbande konstant bei 30 mA und maximal 200 V durchgeführt. Als Protein-Molekulargewichtsstandard diente der 'Protein Molecular Weight' Marker.

Die Proteinbanden in einem SDS Polyacrylamidgel können unter Verwendung des Triphenylmethanfarbstoffes Brilliant Blau R 250 angefärbt werden.<sup>[221]</sup> Zum Entwickeln der Proteinbanden wurde das Polyacrylamidgel mit einer Lösung aus 20 mL Coomassie-Färbelösung unter leichtem Schütteln eingefärbt (15 min). Zum Entfärben wurde das Gel mit Wasser überschichtet und dreimal in der Mikrowelle ausgekocht (5 min). Bei Bedarf wurde anschließend über Nacht in 20 mL Wasser unter leichtem Schütteln entfärbt.

### 3.4.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration einer wässrigen Lösung wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt. Dabei kam die Methode nach Pace et al.<sup>[222]</sup> zur Anwendung, bei der die Proteinkonzentration bei bekannter Zusammensetzung des Proteins über die Absorption von Licht einer Wellenlänge von 280 nm ( $OD_{280}$ ) bestimmt werden kann. Wesentlich beteiligt an der Absorption eines Proteins bei 280 nm sind die Seitenketten der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, sowie die Disulfidbrücken des Proteins. Der molare Extinktionskoeffizient des Proteins errechnet sich demnach nach folgender Gleichung:

$$\varepsilon(\text{Protein}) = 5500 \cdot \sum \text{Trp} + 1490 \cdot \sum \text{Tyr} + 125 \cdot \sum S - S \text{ Brücken} \quad (3)$$

Mit Hilfe des so berechneten molaren Extinktionskoeffizienten lässt sich die Konzentration des Proteins aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz bei  $OD_{280}$  berechnen.

### 3.4.3. Lagerung von Proteinen

Zur dauerhaften Lagerung von Proteinproben wurde die wässrige Lösung mit 10% (v/v) Glycerin bei -80 °C gelagert. Die synthetisierten Miniproteine konnten zudem auch in lyophilisierter Form bei -20 °C eingefroren und gelagert werden.

### 3.4.4. Zellaufschluss von *Escherichia coli*

Um die von Mikroorganismen synthetisierten Proteine zugänglich zu machen, ist ein Aufschluss der Zellmembranen und Zellwände erforderlich. Eine Möglichkeit hierfür ist der mechanische Aufschluss mittels Ultraschall. Dabei werden die Mikroorganismen durch schnelle und starke Druckänderungen aufgeschlossen, die durch den Ultraschall erzeugt werden. Es entstehen kleine Vakuumbälchen, die durch Implosionen Mikroschockwellen und Mikroströmungen erzeugen.

Nach Auftauen der Zellsuspension, wurde diese fünfmal auf Eis beschallt (70 %, 2 min). Aufgrund von starker Wärmeentwicklung wurde zwischen den einzelnen Durchgängen für 3 min abgekühlt. Nach dem Aufschluss wurde zentrifugiert (15 min, 13.000 U/min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Die pelletierten *Inclusion bodies* wurden in Matriptase Harnstoffpuffer aufgenommen und inkubiert (30 min, 25 °C). Anschließend wurde wieder fünfmal auf Eis beschallt (70 %, 2 min) und zentrifugiert (15 min, 13.000 U/min, 4 °C). Das nun gelöste Protein wird steril filtriert und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.



### 3.4.5. Chromatographische Aufreinigung von Proteinen

#### 3.4.5.1. Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Bei der IMAC nutzt man die Eigenschaft von metallchelatierenden Gruppen, um multivalente Übergangsmetallionen zu binden, die so ein oder mehrere Koordinationsbindungen zur Komplexbildung basischer Aminosäureseitenketten in Proteinen bereitstellen.<sup>[223]</sup> Um eine effektive Immobilisierung eines Proteins an einer IMAC zu erreichen benötigt dieses einen C- oder N-terminalen Fusions-Affinitäts-Tag, der aus mehreren aufeinanderfolgenden Histidinen besteht. Als an das Säulenmaterial immobilisiertes multivalentes Metallion dient  $\text{Ni}_2^+$ . Zum Eluieren der immobilisierten Proteine wird Imidazol eingesetzt, das die chelatierten Histidine von der Säulenmatrix verdrängt. Als Säulenmaterial dient 2 mL Chelating Sepharose.

Zur Durchführung der Chromatographie wurde zunächst  $\text{NiCl}_2$  Lösung (5 Säulenvolumen (SV)) über die Säule gegeben, um  $\text{Ni}_2^+$ -Ionen am Säulenmaterial zu immobilisieren. Nach zwei darauf folgenden Waschrufen mit  $\text{H}_2\text{O}$  (5 SV) folgte die Equilibrierung mit Matriptase Harnstoffpuffer (10 SV). Dann wurden die gelösten *Inclusion Bodies* über die Säule gegeben, anschließend wieder mit Harnstoffpuffer (10 SV) gewaschen und Elutionspuffer (5 SV) in mehreren Fraktionen über die Säule gegeben, um immobilisiertes Protein von der Säulenmatrix zu eluieren. Zum Entfernen der  $\text{Ni}_2^+$ -Ionen wurde die Säule mit  $\text{H}_2\text{O}$  (10 SV) gewaschen und dann mit EDTA Lösung (5 SV) regeneriert. Das Säulenmaterial wurde bis zur nächsten Benutzung in 20 % EtOH bei 4 °C gelagert.

#### 3.4.5.2. Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie ist die am häufigsten angewandte Trennmethode für Proteine. Dabei nutzt man kompetitive Wechselwirkung geladener Proteine mit Salzionen. Der isoelektrische Punkt eines Proteins bestimmt, ob es über Kationen- oder Anionenaustauscher gereinigt wird. Für die Ionenaustauschchromatographie wurde ein FPLC Äkta Basic Modell mit einer Q Sepharose Säule benutzt. Das Volumen der Festphase betrug 1 mL. Für den gesamten Reinigungsprozess wurde eine Flussrate von 0,5-1 mL/min eingestellt. Nach Equilibrierung der Säule mit 10 Säulenvolumen Tris HCl (50 mM pH8) erfolgt der Probenaufrag und ein Waschen mit 5 Säulenvolumen. Für die Elution des gebundenen Proteins wurde ein kontinuierlicher Gradient bis 1 M NaCl über 50 Minuten generiert. Der Zeitpunkt der Elution wurde durch Absorption bei 280 nm bestimmt. Die einzelnen Fraktionen wurden in Volumen von 1 mL gesammelt.

### 3.4.5.3. Affinitätschromatographie mit Benzamidinsepharose

Benzamidin ist ein reversibler Inhibitor für Trypsin und Trypsin ähnliche Proteasen. Gebunden an Sepharose wird es zur Entfernung dieser Proteasen aus Proteingemischen benutzt.<sup>[224]</sup> Für die Affinitäts-chromatographie wurde ein Äkta Basic Modell mit einer Benzamidinsepharose Säule benutzt. Das Volumen der Festphase betrug 1mL. Für den gesamten Reinigungsprozess wurde eine Flussrate von 0,5-1 mL/min eingestellt. Nach Equilibrierung der Säule mit 10 Säulenvolumen Tris HCl (50 mM pH8) erfolgen der Probenauftrag und ein Waschen mit 5 Säulenvolumen 1M NaCl, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Anschließend wird die Säule wieder mit Tris HCl (50 mM pH8) equilibriert und die gebundene Protease mit Benzamidinpuffer von der Säulenmatrix eluiert. Benzamidin zeigt bei 280 nm eine hohe Eigenabsorption, deshalb wird das Volumen in einer Fraktion gesammelt und anschließend dialysiert um den Inhibitor zu entfernen.

### 3.4.6. Dialyse

Zum Entfernen von Fremdstoffen wie kleinen Peptiden oder Ionen bzw. zum Überführen von Proteinen in einen anderen Puffer, oder zur Rückfaltung denaturierter Proteine verwendet man die Dialyse, die auf dem Prinzip der Diffusion beruht. Es werden Dialysemembranen mit unterschiedlichen Porengrößen zum Molekulargewichtsausschluss verwendet. Diese Molekulargewichtsausschlussgröße beschreibt das Molekulargewicht der Proteine an, die zu etwa 90 % von der Membran ausgeschlossen werden. Kleine Moleküle diffundieren aus dem Dialyseschlauch und werden über die Dauer der Dialyse stark verdünnt.

Die über IMAC gereinigten Proteinproben wurden zur Dialyse und Rückfaltung in einen Dialyseschlauch mit der Molekulargewichtsausschlussgröße von 12000 - 14.000 gefüllt und mehrere Stunden gegen Matriptase Rückfaltungspuffer I und anschließend gegen Rückfaltungspuffer II dialysiert. Dies geschah entweder bei RT oder 4°C

Die Ionenaustausch- oder Benzamidinsäulen gereinigten Proteinproben wurden zur Dialyse in einen Dialyseschlauch mit der Molekulargewichtsausschlussgröße von 12000 - 14.000 gefüllt und zweimal über mehrere Stunden bei 4 °C gegen PBS dialysiert.

### 3.4.7. *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatographie (RP-HPLC)*

Die RP-HPLC ist eine Methode zur Trennung von Substanzen mit unterschiedlich starker Hydrophobizität. Grundlage hierfür ist die Interaktion des Probenmaterials mit der Säulenmatrix (stationäre Phase) entlang eines Konzentrationsgradienten aus Lösungsmittel und Wasser (mobile Phase).

Die HPLC wurde an einer *Varian Galaxie Chromatographie Workstation* mit einem Detektor vom Typ *Varian Pro Star* und einer Pumpstation der Serie *Varian Prep Star* durchgeführt. Ebenfalls kam für analytische Zwecke ein *Varian 920-LC Analytical HPLC System* zum Einsatz. Es wurden für analytische Trennungen eine *Phenomenex Synergi 4u Hydro-RP 80 Å* (250 × 4.6mm, 4µm, 8nm) Säule und für präparative Trennungen eine *YMC J'sphere ODS H-80, RP C-18* (250 × 20 mm, 4 µm, 8 nm) Säule eingesetzt

Alle RP-HPLC Läufe wurden mit Gradienten von 10 % auf 50 - 80 % Eluent B durchgeführt. Als Lösungsmittel wurden Eluent A (0.1 % aq TFA) und Eluent B (90 % aq Acetonitril, 0.1 % TFA) verwendet. Für die analytische HPLC betrug die Dauer eines Laufes 35-46 Minuten, für die präparative HPLC 48 Minuten. Die Flussrate betrug 1 mL/min für die analytische HPLC und 10 mL/min für die präparative HPLC. Die aufzutragenden Proben wurden in der Lösungsmittelzusammensetzung des Startgradienten gelöst und von nicht löslichen Bestandteilen vor dem Injizieren durch Zentrifugation abgetrennt. Die Detektion der Proben erfolgte bei 220 nm und bei 280 nm.

### 3.4.8. Rückfaltung von Miniproteinen

Die Oxidation der linearen Peptide erfolgte auf mehrere Arten. In Rückfaltungspuffer I durch Oxidation mit Luftsauerstoff. Durch Zugabe zu diesem Puffer von reduzierten (4mM) und oxidierten (2mM) Glutathion. Oder in Rückfaltungspuffer II, einem Gemisch aus Guanidinium, DMSO, TFE und Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Die Konzentration der Peptide im jeweiligen Rückfaltungspuffer betrug 1 bis 1,5 mg/mL. Die Reaktion erfolgte unter Schütteln und bei Raumtemperatur. Die Dauer der vollständigen Reaktion kann einige Tage betragen und wird mittels HPLC und MS überprüft. Die Aufreinigung der gefalteten Peptide erfolgte über RP-HPLC.

### 3.4.9. Lyophilisation

Für das Entfernen von RP-HPLC Eluenten, H<sub>2</sub>O und zum Konzentrieren von Proteinlösungen wurde der Operating Manual Freeze Dryer ALPHA 2-4 LSC mit einer totalen Eiskapazität von 4 kg und einer Kondensationstemperatur von -85 °C verwendet. Das Hochvakuum wurde durch eine Ilmvac Pumpe Typ 109012 erzeugt. Bevor die Proben an die Lyophile angeschlossen werden konnten, wurden diese in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

### 3.4.10. Massenspektrometrische Analyse von Proteinen

Die Bestimmung der Peptide erfolgte mittels LC-MS und ESI-MS an verschiedenen Geräten. Das LC-MS wurde an einem Shimadzu LC-MS 2020 durchgeführt. Es wurde ein zehnminütiger linearer Gradient von 10 % bis 100 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure bei einer Flussrate von 0,2 mL/min verwendet.

Elektronenspray Ionisations Massenspektren (ESI-MS) wurden mit einem *Bruker-Franzen Esquire* LC Massenspektrometer erhalten. Hochauflösende Massenspektren (HRMS-ESI) wurden mit einem *Bruker* Apex-Q IV FT-ICR Massenspektrometer erhalten.

### 3.4.11. Biotinylierung von Proteinen

Die Biotinylierung von Proteinen ist die Grundlage für verschiedenste biologische und biochemische Versuche. Durch die außerordentliche Affinität von Biotin zu Avidin und Streptavidin können biotinylierte Moleküle einfach aus einer komplexen Mischung über Streptavidin-Konjugate selektiert werden. Ebenfalls ist es möglich biotinylierte Proteine nach Bindung an und auf Oberflächen oder andere Moleküle durch Konjugate aus Fluoreszenzfarbstoff und Streptavidin nachzuweisen.<sup>[225]</sup> Voraussetzung für die Biotinylierung von Proteinen sind frei zugängliche Aminogruppen, die am freien N-Terminus von Proteinen oder Seitenketten der Aminosäure Lysin vorliegen. Für die Reaktion wurde Sulfo-NHS-LC-Biotin eingesetzt, womit eine Amidbindung erzeugt wurde.

Das verwendete Biotinderivat wurde in zwanzigfach molarem Überschuss für die Reaktion eingesetzt, inkubiert (1 h, 4 °C) und über eine PD-10 Säule gereinigt. Dazu wurden Protein sowie Biotin in PBS gelöst und ein Volumen von 2,5 mL aufgefüllt und nach Equilibrierung der Säule, mit gewünschtem Puffer (25 mL), aufgetragen. Anschließend wurde das biotinylierte Protein mit Puffer (3,5 mL) eluiert und in Aliquots bei - 20 °C gelagert. Um die Anzahl der gekoppelten Biotin-Moleküle zu ermitteln, wurde zuerst die OD<sub>500</sub> einer HABA/Avidin Lösung ermittelt (900 µL HABA/Avidin). Dann wurden 100 µL des (nötigenfalls vorverdünnten) biotinylierten Proteins zugegeben und erneut die OD<sub>500</sub> bestimmt. Die Biotinkonzentration wurde nach folgender Formel (4) bestimmt, wobei der jeweilige Verdünnungsfaktor einbezogen wurde.

$$\Delta A_{500} = 0,9 \cdot \frac{A_{HABA/Avidin}}{500} - \frac{A_{HABA/Avidin+Sample}}{500} \quad (4)$$

Im Anschluss konnte daraus die Biotin Konzentration berechnet werden.

$$\mu\text{mol Biotin/mL} = \left( \frac{\Delta A_{500}}{34} \right) \cdot (\text{Dilutionfactor of sample}) \quad (5)$$

Um die Anzahl der gekoppelten biotinylierten Moleküle zu berechnen, musste der Quotient aus der errechneten Biotin Konzentration und der eingesetzten Proteinkonzentration gebildet werden.<sup>[226]</sup>

### 3.4.12. Extraktionen von Miniproteinen aus Samen von *Momordica cochinchinensis*

Die getrockneten Samen (3-5g) werden mit Hilfe eines Mörsers und flüssigem Stickstoff zerkleinert. Anschließend werden die Miniproteine mit 20 mL NaOAc (20 mM pH 4,5) über Nacht bei Raumtemperatur unter Schütteln extrahiert. Die Lösung wird filtriert um die festen Bestandteile abzutrennen. Danach wird der Überstand mit 20 mL 40%iger wässriger Acetonlösung versetzt um andere Proteine zu denaturieren. Dabei tritt eine Trübung der Lösung auf. Anschließend wird das Aceton im Rotationsverdampfer entfernt und die Lösung zentrifugiert (30 min, 4000 U/min, 4 °C) und sterilfiltriert. Die weitere Isolierung der verschiedenen Miniproteine erfolgt an der RP-HPLC und die Charakterisierung mittels Massenspektrometrie.

## 3.5. Enzymkinetische Methoden

### 3.5.1. Active-Site Bestimmung Serinproteasen

Für die "active site"-Titration von Serinproteasen können niedermolekulare synthetische Substrate wie z.B. Guanidiumbenzoatderivate eingesetzt werden, die in einer schnellen, nicht messbaren Reaktion mit äquimolarer Stöchiometrie jedes aktive Zentrum in inaktive und unter den Versuchsbedingungen hinreichend stabile Intermediate überführen. Die anschließende langsame Hydrolyse des Enzyms lässt sich dann photometrisch oder fluorometrisch verfolgen.

#### 3.5.1.1. Active-Site Bestimmung von Trypsin

Die Bestimmung von Trypsin erfolgte mit Nitrophenylguanidinobenzoat (NPGb). Dabei wird dieses gespalten und setzt das Chromophor Nitrophenol in zwei Schritten frei.<sup>[227, 228]</sup> Im ersten Reaktionsschritt wird eine dem Gehalt an aktivem Enzym entsprechende Menge an Nitrophenol schlagartig freigesetzt (Burst). Die darauf folgende und geschwindigkeitsbestimmende Spaltung des Intermediats setzt wieder aktive Protease frei, die mit dem im Überschuss vorhandenen Substrat reagiert und damit kontinuierlich Chromophor bildet. Aus dem linearen Verlauf der Absorption kann auf den anfänglichen Sprung extrapoliert und über das Lambert Beersche Gesetz die Konzentration an aktiver Protease berechnet werden. Dazu ist es vorher notwendig, den Extinktionskoeffizienten von Nitrophenol unter den Reaktionsbedingungen zu bestimmen.

Es werden 950  $\mu$ L Trypsinassaypuffer mit 50  $\mu$ L Nitrophenol (1mM) in einer Küvette bei 405 nm vermessen und daraus der Extinktionskoeffizient errechnet. Für die Messung von Trypsin werden 900  $\mu$ L Trypsinassaypuffer mit 50  $\mu$ L NPGb (2mM) und 50  $\mu$ L Protease (10 - 100  $\mu$ M) gemischt und die Absorption bei 405 nm über 10 Minuten in 30 Sekunden Intervallen betrachtet. Die errechnete Konzentration an aktiver Protease wird mit der eingesetzten Menge verglichen und daraus die prozentuelle Aktivität und damit tatsächliche Konzentration des Enzyms bestimmt.

### 3.5.1.2. Active-Site Bestimmung von Matriptase I

Die Bestimmung von Matriptase I erfolgte mit Methylumbelliferylguanidinbenzoat (MUGB), da bei geringeren Konzentrationen der Protease gearbeitet wurde und die Sensitivität von NPGB dafür nicht ausreicht.<sup>[229]</sup> Aus dem linearen Verlauf der Fluoreszenzzunahme kann auf den anfänglichen Sprung extrapoliert und über eine Kalibrierungsgrade aus Methylumbelliferon die Konzentration an enzymatisch aktiver Matriptase I berechnet werden.

Die Kalibrierungsgrade wird mit 180  $\mu\text{L}$  Puffer und 20  $\mu\text{L}$  MU (20 - 200 nM) erstellt. Als Puffer wurden PBS oder Trypsinassaypuffer eingesetzt. Die Messung erfolgt bei 465 nm als Emission und 360 nm als Anregungswellenlinie. Für die Messung werden 160  $\mu\text{L}$  Puffer und 20  $\mu\text{L}$  Matriptaselösung (1  $\mu\text{M}$ -10  $\mu\text{M}$ ) bzw. Puffer für den Leerwert in einer 96 Well-Platte (schwarz, flach) gemischt. Der ELISA Reader wird auf 360 nm Anregung und 465 nm Emission kalibriert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 20  $\mu\text{L}$  MUGB (10  $\mu\text{M}$ ) und danach wird die Messung gestartet und 10 min in 30 Sekunden Intervallen die Emission aufgenommen. Zur Auswertung werden die Fluoreszenzdifferenzen aus der enzymkatalysierten Reaktion und der nicht enzymatischen Substrathydrolyse berechnet, gegen die Zeit aufgetragen und linear auf den Zeitpunkt der Substratzugabe extrapoliert. Durch Eintragen des Wertes in die Gleichung der Kalibrierungsgraden erhält man die Konzentration an aktiver Matriptase I. Diese wird mit der vorgegebenen Proteinkonzentration verglichen.

### 3.5.2. Bestimmung der apparenten Inhibitionskonstante gegen Trypsin

Die Bestimmung der  $K_i$  verschiedener Proteaseinhibitoren erfolgte für Trypsin in 96 Well ELISA Platten (schwarz). Der eingesetzte Fluorophor war Tos-Gly-Pro-Arg-AMC der ein sensibles Substrat für Trypsin darstellt.<sup>[230]</sup> Es wurden 140  $\mu\text{L}$  Trypsinpuffer mit 20  $\mu\text{L}$  Trypsin (1nM) und 20  $\mu\text{L}$  Inhibitor (1 - 100 nM) inkubiert (30 min, 25°C). Anschließend wurden 20  $\mu\text{L}$  Substrat (50 $\mu\text{M}$ ) dazu pipettiert und die Messung über 10 Minuten gestartet. Die Anregung erfolgte bei 360 nm und die Emission bei 465nm. Ebenso wurde eine Messung ohne Inhibitor als Kontrolle durchgeführt. Die erhaltenen Anfangssteigungen der Kurven werden gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen und nach der Morrisongleichung (6) mit Sigmaplot 11.0 gefittet.<sup>[231]</sup>

$$v_i = v_0 \left( 1 - \frac{(E_0 + I_0 + K_{iapp}) - \sqrt{(E_0 + I_0 + K_{iapp})^2 - 4E_0I_0}}{2E_0} \right) \quad (6)$$

Aus dieser Gleichung erhält man die  $K_{iapp}$  die sich bei tight binding Inhibitoren unter diesen Bedingungen nicht signifikant von der  $K_i$  unterscheiden.<sup>[139]</sup>

### 3.5.3. Bestimmung der apparenten Inhibitionskonstante gegen Matriptase

Die Bestimmung der  $K_{iapp}$  gegen Matriptase wird in 96 Well ELISA Platten mit den Chromophoren Boc-Gln-Ala-Arg-pNA oder  $CH_3SO_2$ -D-CHT-Gly-Arg-pNA (Spectrozyme tPA) durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 405 nm über 20 Minuten. Dazu werden 140  $\mu$ L Hepespuffer mit 20  $\mu$ L Matriptase, (50-100 nM) gemischt. Nach Zugabe von 20  $\mu$ L Inhibitor (1nM bis 10 $\mu$ M) wird inkubiert (30 min, 25 °C). Ebenso wurde eine Messung ohne Inhibitor als Kontrolle durchgeführt. Die Messung wird nach Zugabe von 20  $\mu$ L Substrat (5mM) gestartet und die erhaltenen Daten ebenso wie bei der Trypsininhibition ausgewertet.

### 3.5.4. Bestimmung der Inhibitorkonzentration für hochaffine Trypsinbinder

Um verlässliche Werte für die  $K_i$  von *tight binding* Inhibitoren zu erhalten, ist es wichtig vorher ihre aktive Konzentration zu kennen. Dazu macht man sich bei Trypsinhibitoren die Tatsache zunutze, dass bei einer Enzymkonzentration über dem 100fachen der  $K_i$  eine 1:1 Wechselwirkung stattfindet und man die exakte Konzentration durch Messen und Fitten bestimmen kann.<sup>[232]</sup> Dazu werden 140 $\mu$ L Trypsinassaypuffer mit 20 $\mu$ L Trypsin(2 $\mu$ M) und 20 $\mu$ L Inhibitor (1  $\mu$ M-30  $\mu$ M) gemischt und inkubiert (30 min, 25 °C). Anschließend wird die Messung nach Zugabe von 20  $\mu$ L Z-Arg-AMC (600 $\mu$ M) gestartet. Die Detektion erfolgt 10 Minuten lang bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emission bei 465 nm. Die Anfangsteigungen der Kurven werden gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen und nach der Morrisongleichung gefittet.<sup>[231]</sup> Allerdings wird bei dieser Messung der Parameter der Enzymkonzentration nicht festgelegt. Die prozentuelle Abweichung der berechneten Enzymkonzentration von der tatsächlich, vorher *active site* titrierten und eingesetzten Enzymkonzentration lässt durch die 1:1 Wechselwirkung direkt auf die reale Inhibitorkonzentration schlussfolgern.

## 3.6. Zellbiologische Methoden

### 3.6.1. Immunofluoreszenzmarkierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Bei einer Immunofluoreszenzmarkierung zum Induktionsnachweis und Screening wird die entsprechende Anzahl an induzierten Zellen ( $1 \times 10^6$  -  $5 \times 10^8$ ) in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (1 min, 13000 U/min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Zellpellet mit eiskaltem PBS (1 mL) gewaschen. Anschließend werden die Zellen in 50-500  $\mu$ L eiskaltem PBS resuspendiert und 1  $\mu$ L anti myc Antikörper- oder anti HA Antikörper hinzugegeben. Bei Doppelfärbung mit dem Targetmolekül wurde dieses ebenso in entsprechender Konzentration hinzugegeben. Nach 10-30 minütiger Inkubation auf Eis wurde 1 mL PBS addiert und die Zellen bei zentrifugiert (1 min, 13000 U/min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Die gesamte Prozedur wurde mit 1  $\mu$ L anti Maus Biotin Antikörper oder anti Maus FITC Antikörper wiederholt. Wurde zuvor mit Targetprotein oder biotinyliertem Antikörper markiert so erfolgte ein weiterer Schritt mit 1  $\mu$ L Streptavidin R-Phycoerythrin. Die Markierung mit SAPE erfolgte unter Lichtausschluss, da der Fluoreszenzfarbstoff ausbleichen kann. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen auf Eis gelagert und erst kurz vor der Messung im FACS resuspendiert.

### 3.6.2. Durchflusszytometrie von *Saccharomyces cerevisiae*

Für durchflusszytometrische Analysen und fluoreszenzaktivierte Zellsortierungen wurde ein MoFlo-Zellsortiergerät (FACS) verwendet. Der Strahlengang des FACS wurde unter Verwendung fluoreszierender MicroBeads justiert und fokussiert und die Photomultiplier auf die Werte 650 (side scatter), 600 (FL1: FITC-Fluoreszenz) und 600 (FL2: R-Phycoerythrin-Fluoreszenz) eingestellt. Die Anzahl der Ereignisse wurde bei einer Tropfenfrequenz zwischen 95.000 und 100.000 pro Sekunde auf maximal 20.000 pro Sekunde begrenzt. Die Datenverwaltung erfolgte mit dem Softwarepaket Summit v4.0. Für Sortierungen wurde zusätzlich zur Justierung des Strahlengangs und des Flüssigkeitsstrahls der Tropfenabrispungspunkt eingestellt und die Tropfenverzögerung kalibriert. Sortiert wurde grundsätzlich im single-sort-Modus. Positive Zellen wurden in 5 mL Röhrchen sortiert die 1 mL SDCAA Medium beinhalten. Die Frequenz der Ereignisse betrug bei Sortierungen zwischen 1.000 und 10.000 pro Sekunde bei einem Probendruck von 57 bis 59 psi.

Die positiven Zellen wurden anschließend in 5 mL SDCAA-Medium inkubiert (200 U/min, 30 °C) und für weitere Anreicherungsrounds verwendet. Zur Bestimmung der Überlebensrate, sowie der Charakterisierung von Einzelklonen wurden serielle Verdünnungen auf SDCAA-Agarplatten ausgestrichen und bei 30 °C inkubiert.

### 3.6.3. Magnetische Sortierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Durch auf Oberflächen gekoppelte Antikörper oder andere Zielmoleküle lassen sich Zellen, die ein bestimmtes Antigen präsentieren, immobilisieren. Handelt es sich bei dieser Oberfläche um magnetische Partikel, so können diese in einem Reaktionsgefäß mit Hilfe eines Magnetständers aus einer Lösung isoliert werden.

Für die Beladung von Streptavidin beschichteten magnetischen Partikeln mit biotinylierten Proteasen wurden 20 µL Magnetpartikel in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und zuerst mit 500 µL PBS und danach mit 200 µL PBS gewaschen. Zum Entfernen des PBS wurden die Reaktionsgefäße in einen Magnetständer gestellt, der die Magnetpartikel anzieht und diese von der Flüssigkeit separiert. Danach wurden die Magnetpartikel in 200 µL biotinylierter Matriptase (1 µM) oder Trypsin (1 µM) in PBS resuspendiert. Die Magnetpartikel wurden im Thermomixer inkubiert (20 min, 700 U/min, 25 °C). Im Anschluss wurden die Magnetpartikel einmal mit 200 µL eiskaltem PBS gewaschen und das PBS entfernt. Die Magnetpartikel wurden bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis aufbewahrt.

Die Magnetpartikel, auf die zuvor Protease gekoppelt wurde, wurden mit  $5 \times 10^8$  induzierten Zellen inkubiert (10 min, 4 °C). Die Zellen wurden zuvor sedimentiert (1 min, 13000 U/min). Dann wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden in 1 mL PBSF aufgenommen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Reaktionsgefäß in einen Magnetständer gestellt und der Puffer mit den nicht gebundenen Hefezellen entfernt. Darauf folgten zwei Waschschrte mit PBS (1 mL). Die Magnetpartikel mit den verbliebenen Hefezellen wurden in 1 mL SDCAA-Medium resuspendiert und in einem Röhrchen auf 5 mL aufgefüllt und inkubiert (200 U/min, 30 °C).



### 3.7. Mikrowellen gestützte Festphasensynthese von Proteinen

#### 3.7.1. Manuelle Synthese von Proteinen am Discover SPS

Die manuelle Festphasenpeptidsynthese wurde an einem *Discover*<sup>®</sup> SPS Manuel Microwave Peptide Synthesizer der Firma CEM durchgeführt. Zum Entfernen des überschüssigen Lösungsmittels bei jedem Schritt wurde die mitgelieferte Absaugstation mit einem 1 L Glasbehälter genutzt. Als Vakuumpumpe wurde eine im Labor vorhandene Pumpstation genutzt. Zur Temperaturkontrolle während der Reaktion wurde ein Sensor eingesetzt, der in die Reaktionslösung hinzu gegeben wird. Für alle präparativen Ansätze (0.03 mmol bis 0.15 mmol), wurden die Reaktionen in speziellen 25 mL Polypropylengefäßen mit PE Fritten der Firma CEM durchgeführt. Bei kleineren Reaktionsvolumina wurden 2 mL BD Spritzen mit PE Fritten eingesetzt. Nur mit diesen Reaktionsbehältnissen konnte die mitgelieferte Absaugstation richtig genutzt werden. Während der Reaktion im Synthesizer wurden die Reaktionsgefäße mit Kappen am unteren Ende verschlossen, damit kein Lösungsmittel entweichen kann.

##### 3.7.1.1. Handhabung der Festphase

Als Festphase wurde *NovaSyn*<sup>®</sup> TGR Harz verwendet. Das TGR Harz hat eine geringe Beladungsdichte (0.20 bis 0.30 mmol/g) und ist deshalb besonders geeignet Aggregation während der Peptidsynthese durch  $\beta$ -Faltblattstrukturen der Miniproteine zu verringern. Die Harzkugeln haben einen Durchmesser von 90  $\mu$ m. Das Harz wird ohne Fmoc-Schutzgruppe am Benzhydrylaminolinker verwendet, da es eine hohe Stabilität gewährleistet.<sup>[233]</sup>

Vor jeder Benutzung des Harzes muss dieses zuerst in einem geeigneten Lösungsmittel aufgequollen werden.<sup>[234]</sup> Dadurch wird die Festphase vollständig zugänglich für die nachfolgenden Reaktionsschritte. Das Harz wird mit dem 3fachen Volumen an DCM versetzt und 30 Minuten quellen lassen. Anschließend wird das Harz viermal mit NMP gewaschen und zweimal ein Programm (18 Minuten, 20 Watt, 38 °C) im Synthesizer durchgeführt.

Nach Beendigung der Synthese und vor der Lagerung muss das Harz auf seine ursprüngliche Größe geschrumpft und komplett getrocknet werden um alle Spuren von Lösungsmittel zu entfernen. Dabei ist darauf zu achten, dass das Harz im getrockneten Zustand sehr an Plastik oder Glasoberflächen adheriert. Das Harz wird viermal mit NMP und auch viermal mit DCM gewaschen. Anschließend wird das Harz durch viermaliges waschen mit MTBE oder Diethylether geschrumpft und bis zur weiteren Verwendung unter Vakuum im Exsikkator getrocknet und gelagert.

##### 3.7.1.2. Kopplungszyklus

Alle Reaktionen wurden in NMP als Lösungsmittel durchgeführt. Dadurch wird die Neigung der synthetisierten Miniproteine zur Aggregation vermindert.<sup>[235, 236]</sup> Die Kettenverlängerung findet in Zyklen statt. Ein Zyklus umfasst drei bis vier verschiedene Arbeitsschritte. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe (*deprotection*), die Kettenverlängerung (*coupling*) um die jeweilige Aminosäure, das Waschen und falls nötig den Kettenabbruch (*Capping*).

Die Abspaltung der Fmoc Schutzgruppe erfolgt mit einer Lösung von 20 % Piperidin in NMP. Die Entschützung wird mit 1 mL pro 100 mg Harz durchgeführt. Diese wird zum Reaktionsgefäß hinzu gegeben, leicht geschüttelt und im Peptidsynthesizer die entsprechende Programmvariante (50 °C, 30 Watt) durchgeführt. Die Abspaltung umfasst jeweils zwei Durchläufe (30sec, 3min) zwischen denen gewaschen wird, damit das bei der Reaktion entstandene Dibenzofulven entfernt werden kann.

Nach jedem Schritt der Synthese wurde fünfmal mit NMP gewaschen und an der Absaugstation das Lösungsmittel entfernt. Es wurde mit 1 mL pro 100 mg eingesetztem Harz gewaschen. Zwischen den einzelnen Schritten bei der Entschützung und bei zweimaligen Kopplungen wurde jeweils dreimal mit NMP gewaschen und abgesaugt. Nachdem *Capping* wurde siebenmal mit NMP gewaschen um auch letzte Spuren von Acetanhydrid zu entfernen.

Es wurden unterschiedliche Methoden zur Aktivierung eingesetzt, um die Aminosäuren miteinander reagieren zu lassen. Methode 1 wurde für alle verwendeten Aminosäuren außer Cystein und Histidin eingesetzt. Methode 2 wurde ausschließlich für schwierig zu koppelnde Cysteine benutzt und Methode 3 für Cystein und Histidin um Racemisierung zu verhindern.<sup>[237]</sup> Die Reagenzien wurden in der minimalen Menge NMP gelöst und nach der Aktivierungszeit zum Harz ins Reaktionsgefäß gegeben. Es wurde leicht geschüttelt und im Peptidsynthesizer das entsprechende Programm (10 min, 20 Watt, 50 °C, für Cystein/Histidin 40 °C) durchgeführt. Bei schwierigen Sequenzen in der Synthese wurde die Festphase nach der Reaktion gewaschen und derselbe Schritt wurde noch einmal wiederholt (*double coupling*). Einfache Sequenzen wurden einmal durchgeführt (*single coupling*).

Tabelle 3.4 Liste der Aktivierungsmethoden bei der manuellen SPPS

Method	Reagenzien	Menge
<b>1</b>	Fmoc-Aminosäure	4.0 eq
	HATU/HCTU/HBTU	3.9 eq
	DIEA	8.0 eq
	Aktivierungszeit	3 min
<b>2</b>	Fmoc-Aminosäure	5.0 eq
	DIC	5.0 eq
	HOBt	4.9 eq
	Aktivierungszeit	10 min
<b>3</b>	Fmoc-Aminosäure	4.0 eq
	HATU/HCTU/HBTU	3.9 eq
	Collidin	8.0 eq
	Aktivierungszeit	3 min

Nach schwierigen Sequenzen kann es nötig sein, die unreaktierten Aminosäuren am N-Terminus zu verschließen, um Deletionssequenzen zu vermeiden. Dies geschieht mit 2 % Acetanhydrid in NMP mit 1 mL pro 100 mg Harz durchgeführt (50 °C, 20 Watt, 1 min). Das *Capping* wird nach der Kopplung und vor der Entschützung durchgeführt.

### 3.7.1.3. Kaisertest

Der Kaisertest dient zum Nachweis freier Aminogruppen, und damit in der SPPS ob eine Kopplung oder Entschützung erfolgreich war. Es werden einige Beads des Harzes in ein Reagenzglas überführt und mehrmals mit Ethanol gewaschen. Anschließend werden jeweils 3 Tropfen der Kaisertestlösungen 1-3 hinzugeben und auf 120 °C mit einem Fön erhitzt. Durch das in der Lösung enthaltene Ninhydrin ergibt sich bei freien Aminogruppen ein Farbumschlag und die Beads färben sich blau.

### 3.7.1.4. Abspaltung und postsynthetisches Work-up

Das trockene Harz wurde mit einem Abspaltungscocktail versetzt, der sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzte: 230  $\mu$ L TFA, 10 mg DTT, 10 mL Anisol, 5 mL TES, 5 mL H<sub>2</sub>O pro 10 mg Harz. Die Abspaltung für alle Peptide wurde zweimal (18 Minuten, 20Watt, 37°C) durchgeführt.

Nach der Abspaltung wurde die Lösung mit dem Peptid zunächst mit einem Überschuss an kaltem MTBE präzipitiert. Die Menge an MTBE sollte mindestens das Zehnfache des Abspaltungscocktails betragen. Anschließend wurde das Präzipitat inkubiert (30 min, -18 °C). Die Mischung wurde danach zentrifugiert (20 min, 4000 U/min, 4 °C). Die überschüssige Lösung wurde dekantiert und das präzipitierte Peptid wieder mit MTBE gewaschen und zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt um alle Spuren der Abspaltungsreagenzien zu entfernen. Das so erhaltene Peptid wurde unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurde das Peptid an der HPLC von den Verunreinigungen getrennt und mittels Massenspektrometrie analysiert. Nach der Aufreinigung wurde das Peptid mittels Lyophilisation getrocknet.

### 3.7.2. Automatische Synthese von Proteinen am Liberty™

Die automatische Festphasenpeptidsynthese wurde an einem Liberty™ automated Microwave Peptide Synthesizer der Firma CEM durchgeführt. Die Automatisierung erlaubt eine schnellere Synthese mit einer höheren Ausbeute der Miniproteine.

Die Synthese wurde ausschließlich in DMF durchgeführt. Vor jeder Synthese wurde die benötigte Menge an Reagenzien in zum Liberty™ gehörenden Computerprogramm *Pepdriver* errechnet und die entsprechenden Mengen an Aminosäuren (0,2 M), Aktivatoren (0,5 M), Basen (DIEA 2 M, Collidin 0,8 M) und Lösungsmittel in die dafür vorgesehenen Gefäße gefüllt und mit dem Synthesizer verbunden. Das Quellen des Harzes erfolgte in einer Mischung aus DCM und DMF. Alle Kopplungen der einzelnen Aminosäuren erfolgten mit 5 eq. Aminosäuren, 5 eq. Base und 10 eq. Aktivator. Der Aktivator DIEA wurde in NMP gelöst und der Aktivator Collidin als 10%ige Lösung in DMF. Für *double* oder *triple couplings* wurden die Schritte 11 – 16 im *Couplingcycle* mehrfach wiederholt. Die Entschützung erfolgte mit 20% Piperidin und 0,1 M HOBt. Die Reaktionsbedingungen für die jeweilige Kopplung und Entschützung sind in [Tab 3.6] aufgeführt. Nachfolgend sind die einzelnen Reaktionsschritte am Synthesizer am Beispiel einer 0,1 mmol Synthese, wie sie für 500 mg TGR Harz durchgeführt wurde, aufgelistet

Tabelle 3.5 Auflistung der einzelnen Reaktionsschritte am Liberty™ am Beispiel einer 0,1 mmol Synthese. Die einzelnen Zyklen sind das Quellen des Harzes, der Kopplungszyklus, der auch die Entschützung beinhaltet und die finale Entschützung.

No	Operation	Parameter	Volume (mL)	Drain
<b>Swelling</b>				
1	Clean Reaction Vessel - Unfiltered		10,0	Yes
2	Add DMF to Resin		7,0	No
3	Add DCM to Resin		7,0	No
4	Transfer Resin to Reaction Vessel		10,0	Yes
5	Add DMF to Resin		7,0	No
6	Add DCM to Resin		7,0	No
7	Transfer Resin to Reaction Vessel		10,0	Yes
8	Add DMF to Resin		7,0	No
9	Add DCM to Resin		7,0	No
10	Transfer Resin to Reaction Vessel		10,0	Yes
11	Add Reagent	DMF	5,0	No
12	Add Reagent	DCM	5,0	No
13	Wait State	900 secs		No
14	Drain - Filtered			Yes
<b>Coupling</b>				
1	Clean Resin Dip Tube			Yes
2	Wash - Top	DMF	7,0	Yes
3	Add Deprotection		7,0	No
4	Microwave Method	Initial Deprotection		Yes
5	Wash - Top	DMF	5,0	Yes
6	Add Deprotection		7,0	No
7	Microwave Method	Deprotection		Yes
8	Wash - Top	DMF	7,0	Yes
9	Wash - Bottom	DMF	7,0	Yes
10	Wash - Top	DMF	7,0	Yes
11	Clean Resin Dip Tube			Yes
12	Wash - Top	DMF	7,0	Yes
13	Add Amino Acid		2,5	No
14	Add Activator		1,0	No
15	Add Activator Base		0,5	No
16	Microwave Method	Coupling		Yes
17	Wash - Top	DMF	7,0	Yes
18	Wash - Bottom	DMF	7,0	Yes
19	Wash - Top	DMF	7,0	Yes
<b>Final Deprotection</b>				
1	Clean Resin Dip Tube			Yes
2	Wash - Top	DMF	7,0	Yes
3	Add Deprotection		7,0	No
4	Microwave Method	Initial Deprotection		Yes
5	Clean Resin Dip Tube			Yes
6	Add Deprotection		7,0	No
7	Microwave Method	Deprotection		Yes
8	Wash - Top	DMF	7,0	Yes
9	Wash - Bottom	DMF	7,0	Yes
10	Wash - Top	DMF	7,0	Yes

Tabelle 3.6 Verwendete Mikrowellen Methoden für die Kopplung und Entschützung während der Synthese am Liberty™.

<b>Methode</b>	<b>Leistung</b>	<b>Dauer</b>	<b>Temperatur</b>
<b>Initial Deprotection</b>	42 Watt	30 sec	75 °C
<b>Deprotection</b>	42 Watt	180 sec	75 °C
<b>Arginin</b>	0 Watt	1500 sec	75 °C
	25 Watt	300 sec	75 °C
<b>Cystein/Histidin</b>	0 Watt	120 sec	50 °C
	25 Watt	240 sec	50 °C
<b>Standard</b>	21 Watt	300 sec	75 °C

## 4. Ergebnisse und Diskussion

Bevor mit der Untersuchung von Miniproteinvarianten gegenüber Matriptase I begonnen werden kann, ist es im ersten Schritt nötig, das Wildtypprotein auf seine inhibitorischen Eigenschaften gegenüber dieser Protease zu untersuchen.

Dazu wurden MCoTI-II und seine anderen natürlich vorkommenden Varianten aus den Samen von *Momordica cochinchinensis* isoliert und die katalytische Domäne von Matriptase I wurde rekombinant in *Escherichia coli* produziert und aufgereinigt. Abschließend erfolgte die Bestimmung der Inhibitionskonstante.

### 4.1. Isolierung verschiedener MCoTI Varianten aus *Momordica cochinchinensis*

Die Isolierung der Trypsininhibitoren wurde erstmals am Anfang des Jahrtausends beschrieben.<sup>[136, 138]</sup> Dabei wurden drei unterschiedliche Varianten dieser Miniproteinfamilie identifiziert. Die beiden MCoTI-I und MCoTI-II liegen in zyklischer Form vor und unterscheiden sich lediglich durch unterschiedliche Aminosäuresequenzen in der Inhibitorschleife. Bei der dritten Variante MCoTI-III handelt es sich um ein verkürztes lineares Protein, das sich in mehreren Aminosäuren von den beiden unterscheidet. Die Stärke der Trypsininhibition dieser drei Proteine liegt im subnanomolaren Bereich und nimmt von MCoTI-I nach III ab.<sup>[139]</sup> Neben diesen drei Proteinen liegt auch noch eine weitere Isoform von MCoTI-II in den Samen vor. Die  $\beta$ -Aspartyl Variante kann durch Succinimidbildung zwischen Asp<sup>4</sup> und Gly<sup>5</sup> entstehen und nur über RP-HPLC durch die etwas hydrophoberen Eigenschaften von der normalen MCoTI-II Form getrennt werden.<sup>[138]</sup>

Die getrockneten Samen für die Isolierung wurden freundlicherweise von Dr. Olga Avrutina zur Verfügung gestellt. Diese bestanden aus einer harten schwarzbraunen Schale, die zuerst aufgeknackt werden musste und einem Kern der die Miniproteine enthält. Die Miniproteine wurden wie in Methode

3.4.12 beschrieben extrahiert. Anschließend wurden über analytische RP-HPLC (10→50loop) die einzelnen Fraktionen gesammelt und mittels MS-ESI charakterisiert [Abb. 4.1]. Dabei konnten alle vier unterschiedlichen Miniproteinvarianten einzelnen Fraktionen zugeordnet werden. Mit der gesamten Lösung aus der Extraktion wurde dann eine präparative RP-HPLC (10→55loop) durchgeführt, die jeweiligen Proteine lyophilisiert und die erhaltene Menge bestimmt [Tab 4.1].

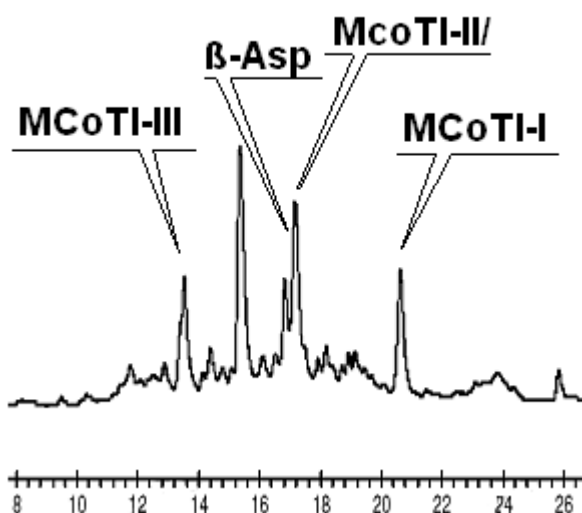


Abbildung 4.1 Analytische RP-HPLC (10→50loop) der Extraktion von MCoTI's aus Samen von *Momordica cochinchinensis*. Die Retentionszeit für MCoTI-I betrug 20,6 min, für MCoTI-II 17,9 min, für die  $\beta$ -aspartyl Isoform 17.1 min und für MCoTI-III 13,5 min.

Tabelle 4.1 Miniproteinvarianten aus RP-HPLC isoliert und mittels MS-ESI charakterisiert, ihre Sequenz und die Ausbeuten.

Miniprotein	Sequenz	Molekular- gewicht [g/mol]	Ausbeute [mg]
MCoTI-I	SGSDGGVCPKILQRCRRDSDCPGACICRGNGYCG	3481	1,5
MCoTI-II	SGSDGGVCPKILKKCRRDSDCPGACICRGNGYCG	3453	1,0
MCoTI-II $\beta$ -asp	SGS( $\beta$ -D)GGVCPKILKKCRRDSDCPGACICRGNGYCG	3453	1,4
MCoTI-III	ERACPRILKKCRRDSDCPGECICKENGYCG	3380	1,9

#### 4.2. Isolierung von Matriptase (MT-SP1) aus *E.coli*

Die Gewinnung von Matriptase kann auf unterschiedliche Weisen erfolgen. So ist in der Literatur die Isolierung aus eukaryotischen Zellen für die gesamte extrazelluläre Domäne beschrieben.<sup>[81]</sup> Eine weitere Möglichkeit ist die Gewinnung für die solitäre katalytische Domäne des Proteins in *E.coli*.<sup>[58]</sup> Für die Untersuchung der Miniproteine und ihrer Eigenschaften gegenüber MT-SP1 ist es ausreichend, lediglich die katalytische Domäne zu produzieren und die Inhibitionskonstanten zu bestimmen.

Das Plasmid pET42dest –His Matriptase 596\_855 wurde durch eine Kooperation von der Fa. Merck KGaA zur Verfügung gestellt, so dass eine Klonierung der ca 29 kDa großen katalytischen Domäne nicht von Nöten war und direkt mit der Expression begonnen werden konnte.

Zunächst wurde eine Transformation in BL21 CodonPlus(DE3)-RP Zellen durchgeführt und auf Cam<sup>r</sup> und Kan<sup>r</sup> Resistenz selektiert (Methode 3.1.5). Von dem so erhaltenen Stamm wurden Glycerolstocks für die spätere Verwendung angefertigt (Methode 3.1.2). Für die Expression wurden die Zellen zunächst in 50 ml dYT Medium angezogen und dann in TB Medium die Produktion durchgeführt (Methode 3.1.7). Die erhaltene Zellmasse, die das gewünschte Protein als *Inclusion bodies* enthält wurde aufgeschlossen (Methode 3.4.4). Das gelöste Protein enthielt einen His-tag am N-Terminus und wurde im nächsten Schritt über eine IMAC Säule aufgereinigt (Methode 3.4.5). Abschließend musste noch die Rückfaltung der Protease erfolgen. Dies geschah über eine zweistufige Dialyse mit unterschiedlichen Puffersystemen (Methode 3.4.6). Dabei bildete sich im zweiten Puffer eine Trübung aus, die zentrifugiert wurde. Dieses Pellet enthielt nicht korrekt gefaltete Proteine. Zurück blieb nur noch gelöste Protease. Die Überprüfung ob das Protein korrekt gefaltet war gestaltete sich in diesem Fall recht einfach, da Matriptase in der Lage ist, sich autokatalytisch zu aktivieren<sup>[238]</sup> und somit einen Teil seines N-Terminus inklusive His-tag abspaltet. Diese Peptidsequenz ist lediglich über eine Disulfidbrücke mit der katalytischen Domäne verbunden und ergab in einer Analyse über reduzierende SDS-PAGE (Methode 3.4.1) eine um ca. 3kDa verkürzte Bande [Abb. 4.2].

Die Konzentration der erhaltenen Proteinmenge wurde durch Berechnung des Extinktionskoeffizienten bestimmt (Methode 3.4.2). Aus einem Liter Kulturvolumen wurden so je Ansatz etwa 10 ml Matriptase mit einer Konzentration im einstelligen micromolaren Bereich erhalten und gelagert (Methode 3.4.3). Zu erkennen war jedoch, dass neben der aktiven auch noch inaktive nicht gefaltete Matriptase im Überstand der Rückfaltung vorhanden war. Deswegen wurde nach Methoden gesucht um den Anteil der aktiven Protease an der Gesamtproteinmenge zu bestimmen.

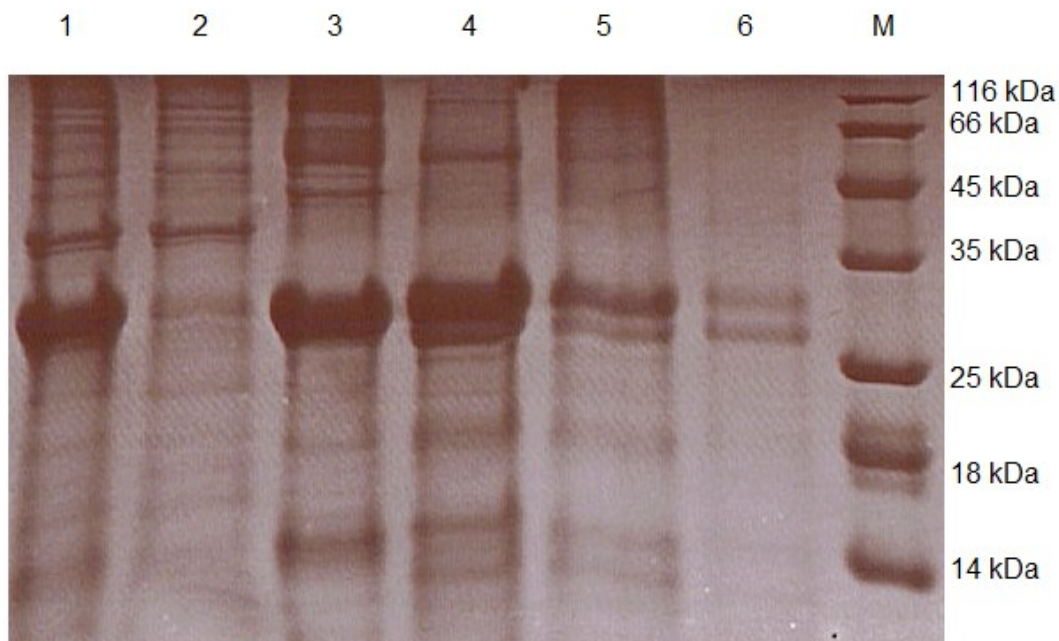


Abbildung 4.2 SDS-PAGE einer Aufreinigungsprozedur von MT-SP1 (29 kDa). Zu erkennen ist, dass eine Expression des Proteins stattgefunden hat. Nach der Rückfaltung ist das autokatalytisch aktive Protein bei ca. 26 kDa zu erkennen, Auftragsschema: (1) Auftrag auf die IMAC Säule. (2) Durchlauf der IMAC Säule. (3) Elution mit Imidazol. (4) Rückfaltungspuffer I. (5) Pellet nach Zentrifugation von Rückfaltungspuffer II. (6) Überstand von Rückfaltungspuffer II. (M) Proteinmarker

#### 4.2.1. Bestimmung der aktiven Matriptasekonzentration

Die Bestimmung der aktiven Enzymkonzentration wurde mit Hilfe des irreversiblen Proteaseinhibitors 4-Methylumbelliferyl-p-guanidobenzoat (MUGB) durchgeführt (Methode 3.5.1.2). Guanidinobenzoate binden in der *active site* von Proteasen. Durch die Spaltung der Carbonylgruppe durch das Enzym wird das Fluorophor Methylumbelliferon freigesetzt, dessen Fluoreszenz vorher unterdrückt war. Dadurch, dass Matriptase nur ein aktives Zentrum besitzt, kann nun direkt die tatsächliche aktive Konzentration bestimmt werden, wenn die relative Fluoreszenz von MU für eine bestimmte Konzentration bekannt ist. Dazu wurde zunächst eine Kalibrierungsgrade erstellt [Abb. 4.3]. Anschließend wurde die Protease in mehreren Konzentrationen, die im Bereich der Kalibrierung liegen, gemessen. Als Ergebnis wurde erhalten, dass lediglich 6% der gesamten Proteinmenge aktiv ist. Deswegen wurde nach Methoden gesucht, die aktive Proteasemenge und Konzentration zu erhöhen.

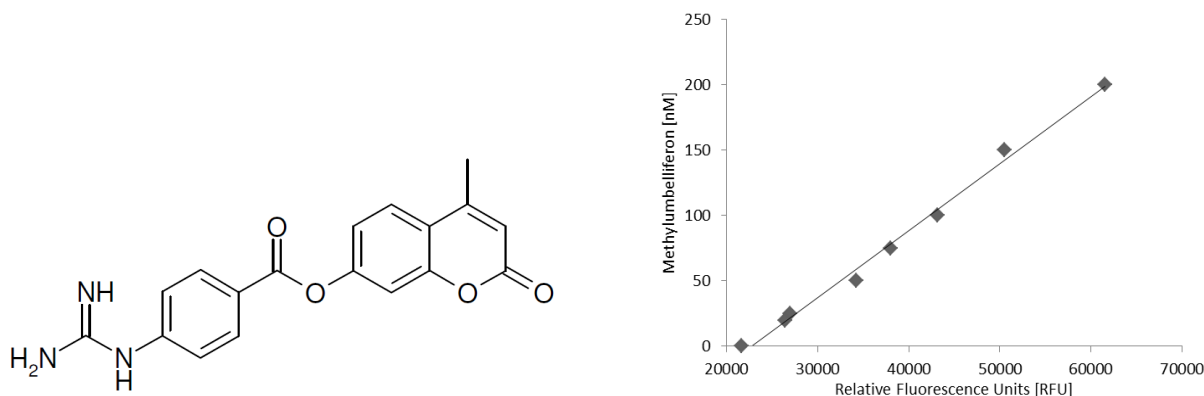


Abbildung 4.3 links: 4-methylumbelliferyl-p-guanidobenzoat (MUGB); rechts: Kalibrierungsgrade mit Methylumbelliferon



#### 4.2.2. Aufreinigung über Ionenaustausch- oder Affinitätschromatographie

In der Literatur sind zwei Methoden beschrieben, die eine weitere Aufreinigung von Matriptase ermöglichen. Die Ionenaustauschchromatographie über einen Anionenaustauscher wie z.B. Q-Sepharose<sup>[107]</sup> oder die Aufreinigung über Affinitätschromatographie mit Benzamidin als reversiblen Proteaseinhibitor.<sup>[58]</sup>

Zunächst wurde die Aufreinigung mit Benzamidin untersucht. Hierzu wurde eine neue Charge Matriptase produziert (Methode 3.1.7) und über IMAC aufgereinigt (Methode 3.4.5.1). Die Proteinlösung wurde auf Benzamidinsepharose aufgetragen, gewaschen und mit einer bei einer Konzentration von 20mM Benzamidin eluiert (Methode 3.4.5.3). Es wurden mehrere Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert (Methode 3.4.1) [Abb. 4.4]. Auf dem Gel ist zu erkennen, dass sich keine Proteine im Durchlauf, Waschlösung und Equilibrierungspuffer befinden (Banden 2-4). Man erkennt, dass lediglich eine Bande bei 26 kDa eluiert wird, die dem gesuchten Protein entspricht (Banden 5-9). Zur Kontrolle wurde auch etwas Protease nach der IMAC Aufreinigung mit aufgetragen (Bande 1). Es ist zu erkennen, dass die Protease nicht in konzentrierter Form eluiert sondern fast gleichmäßig über den gesamten Bereich. Die gesammelten Fraktionen, die MT-SP1 enthalten, wurden daraufhin vereinigt und einer Dialyse unterzogen (Methode 3.4.6), da eine direkte Konzentrationsbestimmung und *active site* Titration der Protease durch die Anwesenheit von Benzamidin nicht möglich ist.

Anschließend wurde von der dialysierten Proteinlösung die Konzentration zu 2  $\mu$ M bestimmt (Methode 3.4.2). Ebenso wurde die Bestimmung der aktiven Matriptasekonzentration durchgeführt (Methode 3.5.1.2). Die Lösung enthielt 25 % aktives Enzym und wurde für die weitere Verwendung gelagert (Methode 3.4.3).

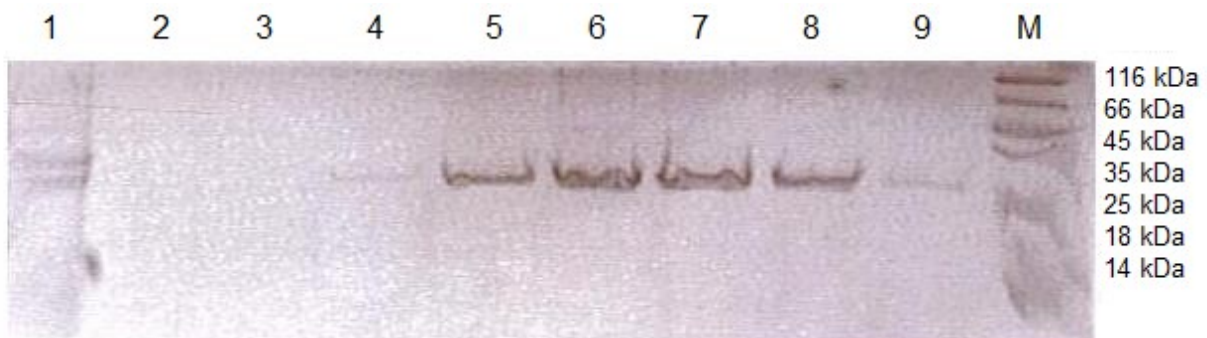


Abbildung 4.4 SDS-PAGE einer Affinitätschromatographie mit Benzamidin. (1) IMAC aufgereinigte Protease. Zu erkennen sind beide Banden bei 29 und 26 kDa. (2) Durchlauf der aufgetragenen Proteinlösung. (3) Waschschriff mit 1M NaCl. (4) Equilibrierungsbuffer nach dem Waschschriff. (5-9) Einzelne Fraktionen der Elution mit 20 mM Benzamidin. Zu erkennen ist, dass die korrekt gefaltete Protease über den gesamten Bereich eluiert. (M) Proteinmarker

Als zweite Methode wurde die kostengünstigere Aufreinigung über Q-Sepharose getestet. Dazu wurde wiederum eine neue Charge Matriptase produziert (Methode 3.1.7) und über IMAC aufgereinigt (Methode 3.4.5.1). Anschließend wurde die Lösung auf die Anionenaustauschersäule aufgetragen und diese gewaschen. Danach folgte die Elution mit einem Salzgradienten von null bis 1M NaCl (Methode 3.4.5.2). Mit einem Detektor bei 280 nm wurden die einzelnen Fraktionen bestimmt die Proteine enthalten und gesammelt. Mit diesen wurden daraufhin eine SDS-PAGE durchgeführt (Methode 3.4.1) um zu bestimmen in welcher Fraktion sich das gewünschte Enzym befindet [Abb. 4.5].

Es ist zu erkennen, dass sich im Durchlauf (Bande 2) eine geringfügige Menge der Proteine befindet, aber das meiste an die Säule gebunden wird. Im Waschschritt ist nichts zu erkennen (Bande 3). Aufgetragen sind weiterhin die über IMAC aufgereinigte Protease (Bande 1) und die erste, mittlere und letzte Fraktion des Peaks mit dem höchsten der höchsten Amplitude im Detektor (Banden 4-6). Man erkennt eindeutig eine Bande bei 26 kDa, bei der es sich um die gesuchte Protease handelt. Es folgte eine Dialyse aller Fraktionen die Matriptase enthalten (Methode 3.4.6). Die Konzentration der Protease wurde zu 8  $\mu$ M bestimmt (Methode 3.4.2) und die Proteinlösung enthielt nach *active site* Titration 40% aktive Protease (Methode 3.5.1.2), welche für die weitere Verwendung gelagert wurde (Methode 3.4.3).

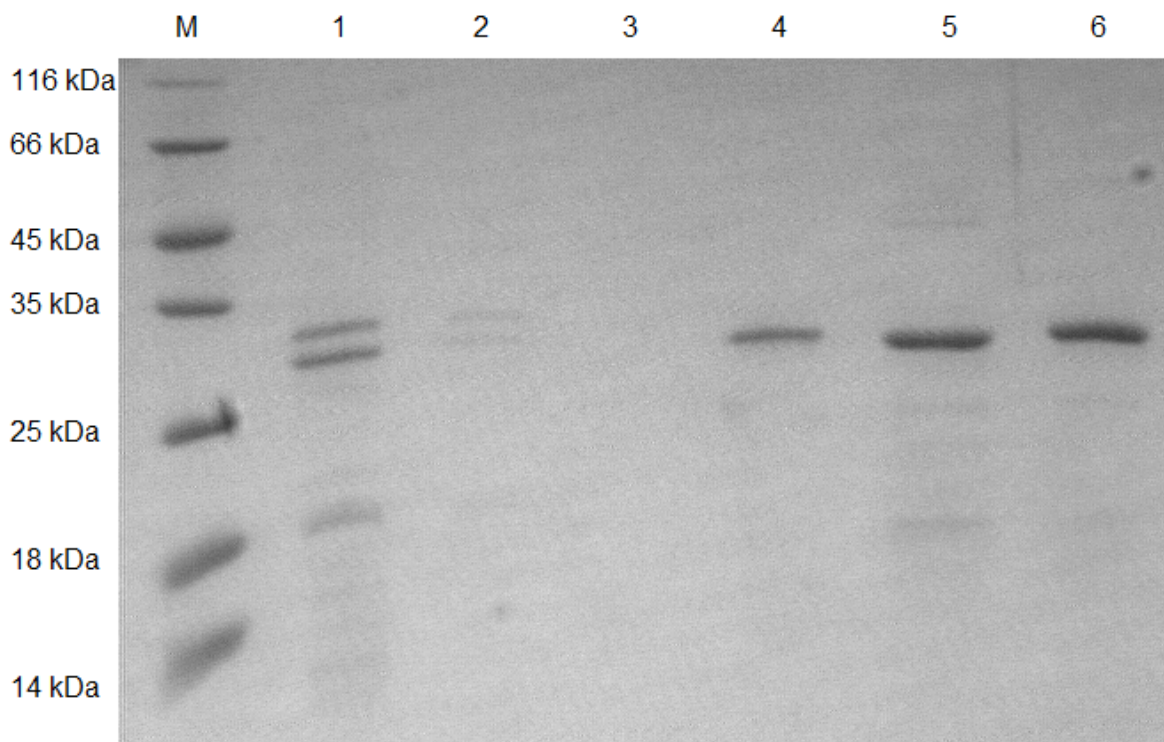


Abbildung 4.5 SDS-PAGE eine Ionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose. (M) Proteinmarker. (1) IMAC aufgereinigte Protease. Zu erkennen sind beide Banden bei 29 und 26 kDa. (2) Durchlauf. Eine kleine Menge der Lösung hat nicht an die Säule gebunden. (3) Waschschritt (4) Erste Fraktion des Peaks mit der höchsten Amplitude. (5) Mittlere Fraktion (6) Letzte Fraktion des Peaks mit der höchsten Amplitude. Zu erkennen ist das dieser Peak die gesuchte Protease enthält.

Im späteren Verlauf dieser Arbeit wurde MT-SP1 ein weiteres Mal nach dieser Methode produziert, um genügend Enzym für das *yeast surface display* zur Verfügung zu haben. Dabei wurde die Proteinmenge wiederum zu 8  $\mu$ M bestimmt, lediglich die *active site* Titration ergab nur 22 % aktives Enzym in der Lösung.

### 4.3. Bestimmung apparenter $K_i$ 's isolierter MCoTI-II Varianten gegenüber MT-SP1

Für eine exakte Bestimmung der Inhibitionskonstante ist es nötig, die genaue Konzentration an Enzym und Inhibitor zu kennen. Die Matriptasekonzentration konnte wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben ermittelt werden. Für die Bestimmung der Inhibitorkonzentration wurde eine bestimmte Menge des jeweiligen Miniproteins an einer analytischen Feinwaage eingewogen und in der entsprechenden Menge Puffer gelöst. Diese Methode lässt jedoch nur einen annähernden Wert zu, da Verunreinigungen und Salze des Lyophilisats ebenfalls in die Konzentrationsbestimmung mit eingerechnet werden, so dass die tatsächliche Konzentration oft geringer ist als angenommen. Ebenfalls können Messfehler zu einem Unterschätzen der Konzentration führen. Deshalb wurde nach einer weiteren Methode gesucht, die Konzentration der Miniproteine exakt zu bestimmen.

#### 4.3.1. Bestimmung der exakten Miniproteinkonzentration

Da es sich bei den verschiedenen MCoTI Varianten um hochaffine reversible sogenannte *tight binding* Inhibitoren handelt, kann die exakte Menge an Inhibitor direkt aus der Reaktion mit Trypsin bestimmt werden.<sup>[139]</sup> Dabei macht man sich zunutze, dass bei Enzymkonzentrationen weit über der  $K_i$  jedes einzelne Enzymmolekül von einem vorhandenen Inhibitor-molekül blockiert wird. Durch diese 1 zu 1 Wechselwirkung kann durch Messung mit verschiedenen Mengen an Inhibitor die exakte Konzentration desselbigen durch Extrapolation bestimmt werden.<sup>[232]</sup>

Für die Bestimmung der Miniproteinkonzentration musste zunächst die Konzentration von Trypsin bestimmt werden. Dies geschah durch Titration mit dem irreversiblen Inhibitor NPGB, der durch seine Spaltung das Chromophor p-Nitrophenol freisetzt (Methode 3.5.1.1). Anschließend erfolgte die Bestimmung der Inhibitorkonzentration (Methode 3.5.4). Zur Kontrolle, ob diese experimentelle Durchführung verlässlich ist, wurde die Inhibitionskonstante gegenüber Trypsin für die isolierten MCoTI Varianten durchgeführt (Methode 3.5.2) und mit den Literaturwerten verglichen [Tab. 4.2].

Tabelle 4.2 Experimentell bestimmte apparente Inhibitionskonstanten für isolierte MCoTI Varianten gegen Trypsin und Vergleich mit vorhandenen Literaturwerten.<sup>[139]</sup>

Miniprotein	$K_{iapp}$ [nM]	Literaturwerte [nM]
MCoTI-I	0,03	0,02
MCoTI-II	0,06	0,03
MCoTI-II ( $\beta$ -asp)	0,5	Nicht vorhanden
MCoTI-III	1	0,5

### 4.3.2. Matriptase (MT-SP1) Inhibition

Mit den in den vorhergehenden Abschnitten exakt ermittelten Inhibitor- und Enzymkonzentrationen konnte nun die Bestimmung der Inhibitionskonstanten gegen Matriptase für die einzelnen MCoTI Varianten durchgeführt werden (Methode 3.5.3). Die Messung erfolgte mit dem Chromophor  $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{-D-CHT-Gly-Arg-pNA}$ . Die Inhibitionskonstanten wurden durch einen Fit mit der Morrisongleichung erhalten [Abb. 4.6].<sup>[231]</sup> Die Messung wurde zweimal durchgeführt und der Mittelwert aus beiden Messreihen für die  $K_{iapp}$  bestimmt.

Tabelle 4.3 Getestete MCoTI Varianten, die Sequenz der Inhibitorschleife und die errechneten  $K_{iapp}$  Mittelwerte.

Miniprotein	Inhibitorschleifensequenz	Mittelwert $K_{iapp}$ [nM]
MCoTI-I	-CPKILQRC-	> 1000
MCoTI-II	-CPKILKKC-	235
MCoTI-II ( $\beta$ -asp)	-CPKILKKC-	390
MCoTI-III	-CPRILKKC-	275

Die Werte zeigen, dass die apparente Inhibitionskonstante im dreistelligen nanomolaren Bereich für MCoTI-II und III liegt [Tab. 4.3]. Ein deutlicher Unterschied von MCoTI-I ist zu erkennen, dessen  $K_{iapp}$  nicht genau bestimmt werden konnte, da sie weit über dem Messbereich lag. Die  $\beta$ -asp Variante zeigt etwas schlechtere Inhibition, was auf die veränderte Molekülstruktur durch das  $\beta$ -Aspartyl zurück zu führen ist.

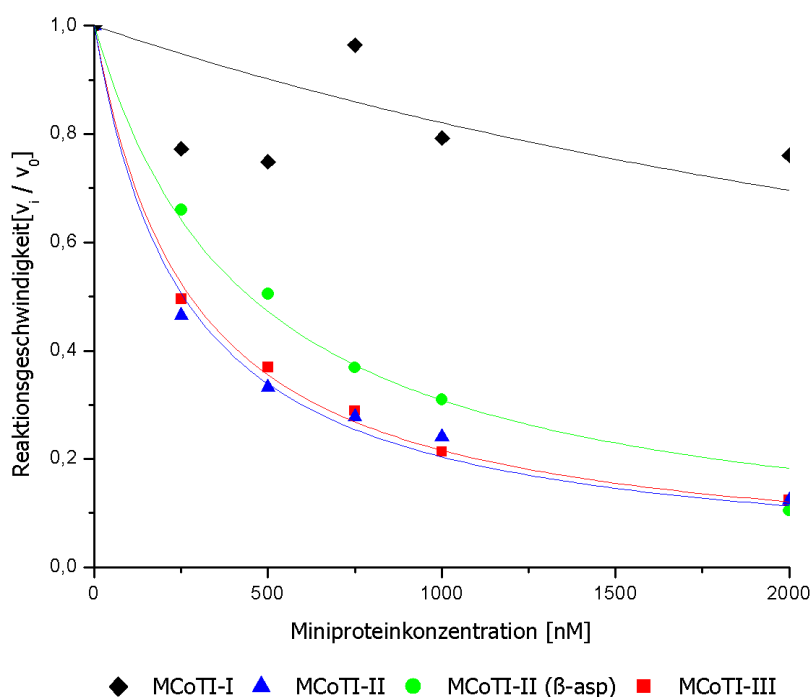


Abbildung 4.6 Graphische Darstellung einer Messreihe der MCoTI Varianten zur Bestimmung der apparenten Inhibitionskonstanten gegen Matriptase. MCoTI-II,  $\beta$ -asp und MCoTI-III zeigen Inhibition im dreistelligen nanomolaren Bereich. MCoTI-I zeigt nahezu keinerlei Inhibition gegen diese Protease.

#### 4.4. Diskussion I

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit sollten die natürlichen MCoTI-Varianten aus den Samen von *Momordica cochinchinensis* isoliert und auf ihre inhibitorischen Eigenschaften gegenüber Matriptase hin untersucht werden. Die Isolierung erfolgte nach Literaturangaben<sup>[136]</sup> und konnte problemlos mit hinreichender Ausbeute für die nachfolgenden Untersuchungen durchgeführt werden. Zur exakten Bestimmung der Inhibitionskonstante ist es auch nötig, die exakte Menge an aktivem Inhibitor zu kennen. Wiegt man die Proben nur ein, erhält man dadurch auch einen Wägefehler in der Bestimmung der  $K_i$ . Bei *tight binding* Inhibitoren wie MCoTI I-III bietet sich jedoch die Möglichkeit an, über eine Titration mit Trypsin, dem natürlichen inhibierten Protein, die exakte Konzentration in Lösung zu bestimmen.<sup>[139]</sup>

Für die isolierten Varianten zeigte sich eine breite Varianz in der aktiven Konzentration von 35-110% eingewogenem Proteinlyophilisat. Durch eine weitere Kontrolle, der  $K_{iapp}$  Bestimmung ebenfalls gegen Trypsin konnte die Verlässlichkeit dieser Methode bestätigt werden, da sich die erhaltenen Werte kaum von den in der Literatur bekannten Werten unterscheiden.

Die Synthese der katalytischen Domäne von MT-SP1 aus *E.coli* ist bereits in der Literatur bekannt.<sup>[58]</sup> Zusammen mit dem Plasmid wurde ebenfalls das Expressions- und Aufreinigungsprotokoll von der Fa. Merck KGaA erhalten und an die vorhandenen Möglichkeiten im Labor adaptiert. Ebenfalls wurde eine Vergleichsprobe von bereits produzierter Matriptase dankenswerterweise zur Verfügung gestellt. Die Ausbeuten der IMAC Aufreinigung waren vergleichbar mit der zur Verfügung gestellten Probe. Die Aktivität war zunächst jedoch nicht zufriedenstellend, da die selbst produzierte Menge an Protease mit der Vergleichsprobe wesentlich geringere proteolytische Aktivität aufwies (Daten nicht gezeigt).

Daraufhin wurde nach Methoden gesucht, um die Konzentration, Reinheit und Aktivität der Protease zu erhöhen. Eine gute Möglichkeit bietet dazu eine mit dem reversiblen Proteaseinhibitor Benzamidin durchgeführte Affinitätschromatographie.<sup>[58]</sup> Untersuchungen daran zeigten auf, dass eine weitere Aufreinigung der Protease erfolgreich war und mit einer Erhöhung der spezifischen Aktivität des Enzyms einherging [Abb. 4.4]. Jedoch war es nicht möglich eine Aufkonzentrierung zu erhalten, da die an der Säulenmatrix gebundene Protease nicht auf einmal eluiert sondern über mehrere Fraktionen. Ein weiteres Problem stellt die anschließende zweimalige Dialyse dar, da hierbei eine weitere Verdünnung der Probe stattfindet.

Eine andere Möglichkeit der Aufreinigung bietet der Einsatz eines Ionenaustauschers. Da sich der isoelektrische Punkt der katalytischen Domäne von Matriptase im leicht basischen Bereich befindet, kann eine Aufreinigung über einen Anionenaustauscher erfolgen.<sup>[107]</sup> Diese Methode lieferte ebenfalls eine deutlich erhöhte Reinheit [Abb. 4.5]. Die Aktivität der Proteaselösung konnte so um ein vielfaches gesteigert werden und lag sogar über der vorhandenen Vergleichsprobe.

Damit wurden die Voraussetzungen für weitere Untersuchungen der Protease mit den unterschiedlichen MCoTI Varianten geschaffen und die Inhibition gegen Matriptase bestimmt. Aus den erhaltenen Messdaten wurde die lineare Anfangssteigung bei unterschiedlichen Inhibitor-konzentrationen bestimmt und gegen die Miniproteinkonzentration aufgetragen. Aus diesem Diagramm [Abb. 4.6] wurde dann mithilfe der Morrisongleichung die apparente Inhibitionskonstante errechnet.<sup>[231]</sup> Für MCoTI-I stellte sich heraus, dass in dem gemessenen Bereich keine Inhibition stattfand, für die anderen drei Varianten wurden  $K_{iapp}$ 's im dreistelligen nanomolaren Bereich errechnet [Tab 4.3].

Der Unterschied zu MCoTI-I liegt an einem Glutamin und Argininrest in der Inhibitorschleife, was darauf schließen lässt, dass das Vorhandensein eines Lysinrestes an diesen Positionen eine wichtige Funktion für die Bindung an Matriptase bedeutet. Ebenfalls ist die  $\beta$ -asp Variante von MCoTI-II etwas schlechter als die normale Variante von MCoTI-II, was auch auf einen negativen Einfluss auf die Bindung schließen lässt.

Betrachtet man sich das aktive Zentrum der Protease, so sieht man, dass Matriptase ein stark negativ geladenes aktives Zentrum besitzt [Abb. 4.7]. Die S1 Tasche ähnelt der von Trypsin sehr und akzeptiert entweder Lysin oder Arginin gleichermaßen. Die S2 Tasche ist sehr klein und wird durch Phe<sup>99</sup> begrenzt, sie bevorzugt kleine ungeladene Aminosäuren. In der S3 Tasche erfolgen Wechselwirkungen mit Asp<sup>217</sup> und in der S4 Tasche mit Phe<sup>97</sup>, weshalb an dieser Position geladene Aminosäuren wie Arginin oder hydrophobe wie Tyrosin bevorzugt werden. Auf der gegenüberliegenden Seite wird die S1' und S3' Tasche von Tyr<sup>60</sup> und Trp<sup>64</sup> begrenzt und bevorzugt kleine hydrophobe Aminosäuren. Ebenso präferiert die S2' Tasche durch Gln<sup>192</sup> und His<sup>143</sup> hydrophobe Aminosäuren.<sup>[88]</sup> Diese Eigenschaften der Protease liefern eine plausible Erklärung für eine bessere Inhibition von MCoTI-II gegenüber MCoTI-I, das ein Glutamin anstelle des Lysin in der Inhibitorschleife aufweist.

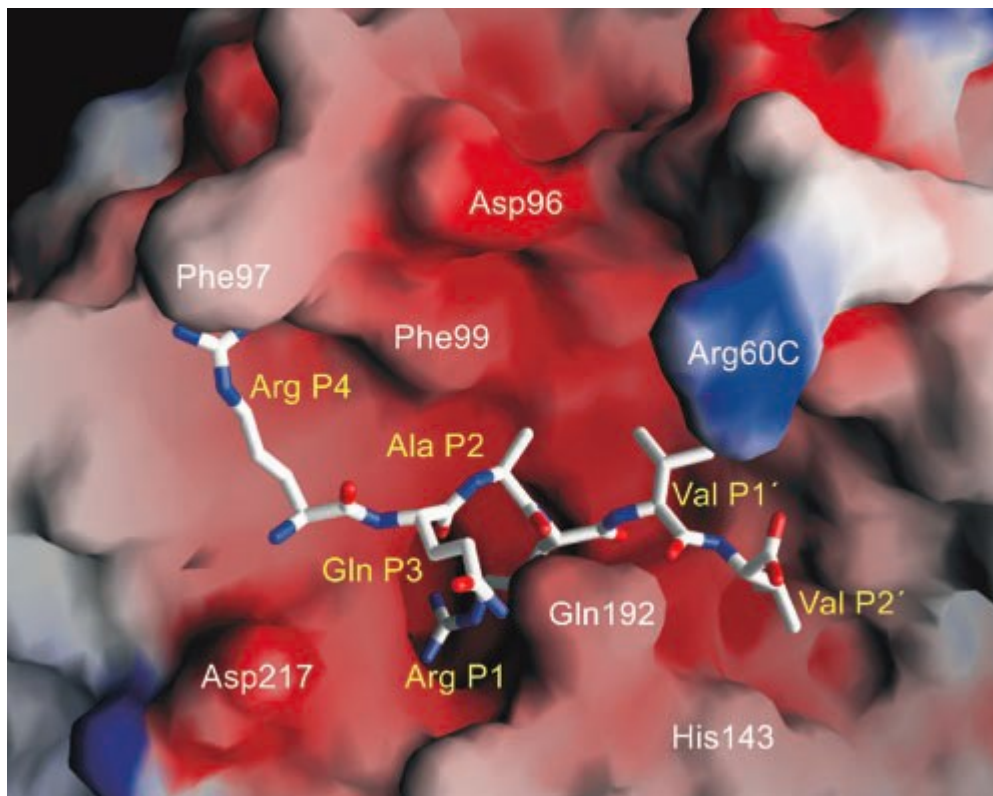


Abbildung 4.7 Computermodell des katalytischen Zentrums von MT-SP1 mit einem Hexapeptid, das der Aminosäuresequenz entspricht an denen die autokatalytische Aktivierung erfolgt. Die elektrostatischen Potentiale sind rot für negativ und blau für positiv dargestellt. Aminosäuren, die eine wichtige Funktion bei der Substratbindung darstellen, sind benannt, ebenso die einzelnen Aminosäuren des Substrats und ihre Positionen von P4 bis P2'. Modifiziert nach<sup>[88]</sup>

Die Befunde der Inhibition von Matriptase durch MCoTI-II und MCoTI-III bilden eine gute Grundlage, um durch Mutationen in diesen *scaffolds* Varianten mit verbesserter Bindung an die Protease zu finden. In dieser Arbeit wurde nachfolgend nur mit MCoTI-II als *scaffold* weitergearbeitet, da es das beste charakterisierte Protein und durch chemische Synthese leicht darzustellen ist.



#### 4.5. Rationales Protein Design verschiedener MCoTI-II Varianten

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurden unterschiedliche Varianten von MCoTI-II chemisch synthetisiert und auf ihre Inhibition gegenüber Matriptase getestet. Die Auswahl der Varianten erfolgte durch ein computergestütztes Modell der Inhibition von Matriptase durch oMCoTI-II.

Dieses molekulare Modelling und die Auswahl der zu modifizierenden Positionen wurde unter Benutzung des Programmes PyMol durchgeführt. Dazu wurden die aus der Literatur bekannten Komplexe von Matriptase/BPTI<sup>[88]</sup> und Trypsin/EeTI<sup>[239]</sup> sowie die Struktur vom oMCoTI-II<sup>[240]</sup> aus der PDB Datenbank für Kristallstrukturen erhalten. Die verwendete MCoTI-II Sequenz entspricht der in Abschnitt 4.6.1. synthetisierten Variante I.

Als erster Schritt erfolgte das Laden des Trypsin/EeTI Komplexes in das Programm. Anschließend wurden die Positionen der katalytischen Triade und des Lysin in P1 Position fixiert und der der Proteinsequenzen gelöscht. Im zweiten Schritt wurde dann aus dem Matriptase/BPTI Komplex der Inhibitor entfernt und die Protease wurde in das Modell aus Schritt 1 eingefügt und beide katalytischen Triaden wurden übereinander gelegt und superpositioniert. Danach erfolgte im dritten Schritt das Einfügen der oMCoTI-II Struktur mit einer Superpositionierung der beiden Lysine in P1 Position. Im abschließenden vierten Schritt wurde noch eine Energieminimierung der Wechselwirkungen zwischen Protease und Inhibitor durchgeführt.

Betrachtet man den modellierten Komplex aus Matriptase und oMCoTI-II [Abb. 4.8], so ist zu erkennen, dass das Miniprotein sich gut in das aktive Zentrum der Protease anpasst und in der Elektronenwolkenendarstellung rechts keine Überlappungen festzustellen sind. Aufgrund dieser Tatsache wurden das Aminosäuren Rückgrat des Inhibitors dargestellt und die Positionen die für eine Veränderung in Frage kommen bestimmt. Zu erkennen sind im linken Bild in Grün die Aminosäuren der katalytischen Triade, in Gelb dargestellt das Miniprotein, in blau die Protease und in Rot die Stellen, die für eine Modifikation in Frage kommen. Diese Positionen weisen eine Nähe zu charakteristischen Aminosäuren in den Substrattaschen auf, die durch einen Austausch in der Inhibitorsequenz eine bessere Bindung ermöglichen könnten.

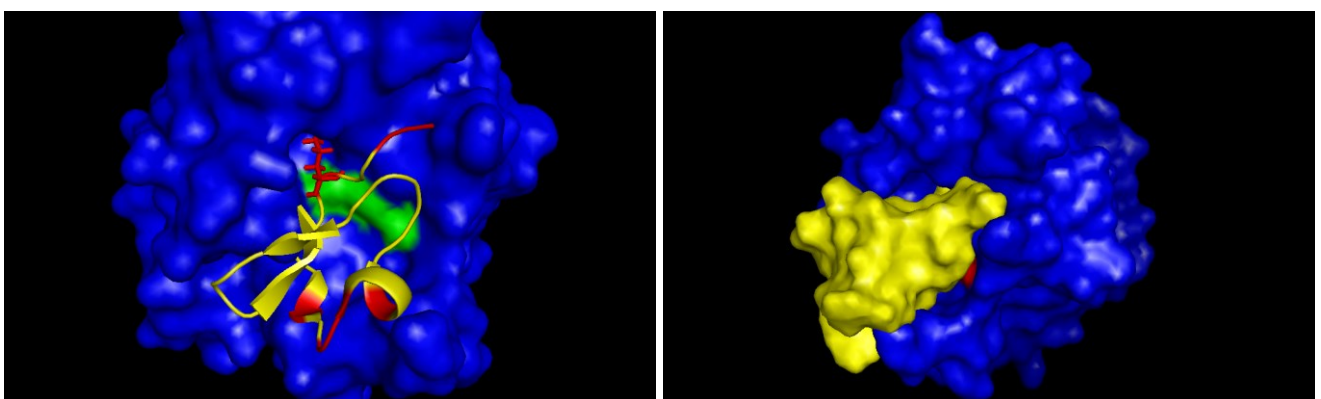


Abbildung 4.8 Computermodell von Matriptase/oMCoTI-II aus den Kristallstrukturen von Matriptase/BPTI, Trypsin/EeTI und oMCoTI-II. Dabei wurden die katalytische Triade (Grün) und die Lysine in P1 Position der jeweiligen Proteasen und Inhibitoren superpositioniert, um den neuen Komplex zu erhalten. In blau MT-SP1. In gelb das Miniprotein. Rechts dargestellt die Elektronenwolken-dichte beider Proteine, links dargestellt das Aminosäuren Rückgrat des Inhibitors und in rot markiert die Positionen, die für eine Modifikation in Frage kommen.

Als erste auszutauschende Aminosäure von oMCoTI-II wurde Lys<sup>5</sup> ausgewählt, da es in dem Komplex an P1 Position sitzt und durch einen Austausch zu Arginin möglicherweise bessere Bindung erfolgen kann. Eine weitere Möglichkeit stellt der Austausch von Lys<sup>9</sup> gegen Glutamin dar. Dadurch wird in P3' eine kürzere Aminosäure bei ebenfalls positiver Teilladung eingefügt und so eine größere Flexibilität in der Bindung erhalten. Die Positionen P2 und P3, welche dem Prolin und Cystein im Miniprotein entsprechen wurden nicht verändert, da dann eine Ausbildung des Cystinknoten nicht mehr möglich wäre. Betrachtet man sich aber den N-Terminus von oMCoTI-II im Komplex mit der Protease, so liegt dieser in unmittelbarer Nähe zu Phe<sup>97</sup>. Diese Stelle bietet ausgezeichnete Möglichkeiten, hydrophobe Wechselwirkungen zu erzeugen und damit eine bessere Bindung zu erhalten. Dies sollte erreicht werden durch das Einfügen von aromatischen Aminosäuren an Position 1 und 2. Hierzu bietet sich ein Austausch von Gly<sup>1</sup> gegen Tyrosin oder Val<sup>2</sup> gegen Tryptophan an. Ebenso könnte aber auch eine Wechselwirkung mit Asp<sup>217</sup> erfolgen. Deswegen wurde ein Austausch von Gly<sup>1</sup> zu positiv geladenem Asparagin beschlossen, das mit Hilfe des Aspartates der Protease stabilisiert werden kann.

Weitere Modifikationen bieten sich außerhalb der Inhibitorschleife des Miniproteins an, insbesondere im benachbarten Bereich bis zur 3<sub>10</sub> Helix hin. Die Aminosäuren 11-15 weisen eine große Nähe zu Arg<sup>60</sup>C der Protease auf. Hierdurch kann es zu ungünstigen sterischen Wechselwirkungen kommen. So befindet sich an den Positionen 11 und 12 jeweils ein Arginin welches die gleiche positive Ladung in seiner Seitenkette besitzt wie die Protease an dieser Stelle und sich die beiden Reste dadurch abstoßen könnten. Durch das Einfügen von negativ geladenen Aminosäuren wie Serin sollte dieser Einfluss verringert und gleichzeitig durch gegenseitige Anziehungskräfte stabilisiert werden. Es sollten jeweils einzelne Varianten, in denen nur ein Arginin gegen ein Serin ausgetauscht wurde, sowie eine kombinierte Variante bei der beide Aminosäuren ausgetauscht werden, hergestellt und getestet werden. An Position 15 im Miniprotein befindet sich bereits mit einem Aspartat eine negativ geladene Aminosäure, die allerdings durch einen Austausch gegen ein Glutamat im Computermodell besser gegenüber Arg<sup>60</sup>C positioniert werden kann und dadurch eine stabilere Bindung ermöglichen sollte.

Neben diesen einzelnen Punktmutationen gibt es noch die weitere Möglichkeit eines Austausches der gesamten Inhibitorschleife gegen eine bereits bekannte Inhibitionssequenz, da bekannt ist, dass MCoTI-II eine Vielzahl von Modifikationen toleriert.<sup>[139]</sup> So ist in der Literatur ein selektiver und hochaffiner Inhibitor gegenüber Matriptase auf Basis des Serin Protease Inhibitors Eglin C beschrieben.<sup>[107]</sup> Dieser Inhibitor weist in seiner nativen Konformation keine Inhibition gegenüber MT-SP1 auf, konnte aber nach dem Austausch mehrere Aminosäuren mittels gerichteter Evolution Matriptase mit einer Inhibitionskonstante von 4,5 nM inhibieren. Die Inhibitionssequenz von P4 bis P4' lautet Pro-Val-Thr-Arg-Asp-Leu-Arg-Lys. Dabei entspricht die Sequenz der Eglin C Variante von P1' bis P4' fast der Inhibitorschleife von MCoTI-II mit Ausnahme des Aspartates in P2'. Dies könnte darauf schließen lassen, dass ein Austausch dieser Aminosäuren im Miniprotein eine drastische Verbesserung der Inhibition mit sich bringen könnte und so sollten die Positionen P1'-P4' in der Inhibitorschleife eingefügt werden.

Diese Auswahl an zehn oMCoTI-II Varianten [Tab. 4.4] wurde in den nächsten Schritten synthetisiert und auf ihre inhibitorischen Eigenschaften gegenüber Matriptase hin untersucht.



Tabelle 4.4 Zusammenfassung der geplanten oMCoTI-II Varianten.  
In rot markiert die ausgetauschten Aminosäuren.

Name	Sequenz
oMCoTI-II	GVC PKILKKRRDSDCPGACICRGNGYCG
oMCoTI-N1	<b>N</b> VCPKILKKRRDSDCPGACICRGNGYCG
oMCoTI-Y1	<b>Y</b> VCPKILKKRRDSDCPGACICRGNGYCG
oMCoTI-W2	G <b>W</b> CPKILKKRRDSDCPGACICRGNGYCG
oMCoTI-R5	GVC <b>P</b> ILKKRRDSDCPGACICRGNGYCG
oMCoTI-Q9	GVC PKIL <b>Q</b> KRRDSDCPGACICRGNGYCG
oMCoTI-S11	GVC PKILKK <b>S</b> RDSDCPGACICRGNGYCG
oMCoTI-S12	GVC PKILKKCR <b>S</b> SDCPGACICRGNGYCG
oMCoTI-E15	GVC PKILKKRRD <b>S</b> ECPGACICRGNGYCG
oMCoTI-S11/S12	GVC PKILKK <b>S</b> <b>S</b> SDCPGACICRGNGYCG
oMCoTI-R5/D6/R8	GVC <b>P</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>R</b> KRRDSDCPGACICRGNGYCG

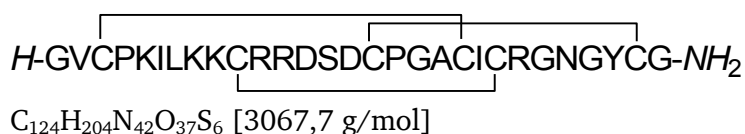
## 4.6. Chemische Synthese designer MCoTI-II Varianten

Die einzelnen rational designten Varianten wurden anschließend mittels manueller *solid phase peptide synthesis* hergestellt. Dazu wurden, wenn möglich, gemeinsame Ansätze durchgeführt die vor den unterschiedlichen Aminosäuren aufgeteilt wurden.

### 4.6.1. oMCoTI-II

Die Synthese von oMCoTI-II erfolgte zweimal während dieser Arbeit, einmal als manuelle Synthese wie in Abschnitt 3.7.1 und einmal als automatische Synthese wie in Abschnitt 3.7.2 beschrieben. Dabei unterscheiden sich beide Varianten durch ein zusätzliches Serin am C-Terminus für die automatisch synthetisierte Variante.

#### Variante I

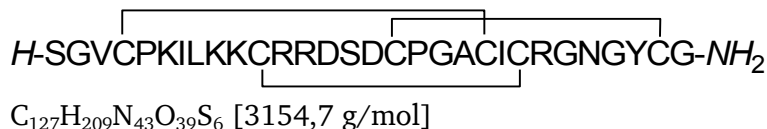


Für die manuelle Synthese wurden 500 mg TGR-Harz eingesetzt und bis zur zwanzigsten Aminosäure synthetisiert. Anschließend wurde die Menge des Harzes gewogen (ca. 1g) und mit 150 mg davon die weitere Synthese durchgeführt. Nach der Abspaltung vom Harz und ebenso der Rückfaltung erfolgte eine Analyse mittels RP-HPLC und ESI-MS, anschließend erfolgte die präparative HPLC. Die Ausbildung der Disulfidbrücken wurde in Rückfaltungspuffer I durchgeführt. Es wurden 5,5 mg Ausbeute erhalten.

HPLC:  $R_t = 15,6$  min (10→55 in 30 min)

MS ESI m/z: 1534,9[M+2H]<sup>2+</sup> 1023,6[M+3H]<sup>3+</sup>

#### Variante II



Für die automatische Synthese wurden 500 mg TGR-Harz eingesetzt. Nach der Abspaltung vom Harz und ebenso der Rückfaltung erfolgte eine Analyse mittels RP-HPLC und ESI-MS, anschließend erfolgte die präparative HPLC. Es wurden 50 mg lineares Peptid erhalten. Die Ausbildung der Disulfidbrücken wurde in Rückfaltungspuffer II mit 5 mg durchgeführt. Es wurden 3 mg Ausbeute erhalten.

HPLC:  $R_t = 9,1$  min (10→80 in 20 min)

MS ESI m/z: 1578,4[M+2H]<sup>2+</sup> 1052,6[M+3H]<sup>3+</sup>

#### 4.6.2. oMCoTI-N1



$C_{126}H_{207}N_{43}O_{38}S_6$  [3124,7g/mol]

Für die manuelle Synthese wurden 250 mg TGR-Harz aus der Synthese des Vorläuferpeptides für oMCoTI-II Variante I eingesetzt und bis zur vorletzten Aminosäure synthetisiert. Anschließend wurde das Harz zu gleichen Teilen für MCoTI-N1 und MCoTI-Y1 verwendet und die Synthesen vervollständigt. Nach der Abspaltung vom Harz und ebenso der Rückfaltung erfolgte eine Analyse mittels RP-HPLC und ESI-MS, anschließend erfolgte die präparative HPLC. Die Ausbildung der Disulfidbrücken wurde in Rückfaltungspuffer I durchgeführt. Es wurden 5 mg Ausbeute erhalten.

HPLC:  $R_t = 15,9$  min (10→55 in 30 min)

MS ESI m/z: 1563,4[M+2H]<sup>2+</sup> 1042,6[M+3H]<sup>3+</sup>

#### 4.6.3. oMCoTI-Y1



$C_{131}H_{210}N_{42}O_{38}S_6$  [3173,8 g/mol]

Für die manuelle Synthese wurden 250 mg TGR-Harz aus der Synthese des Vorläuferpeptides für oMCoTI-II Variante I eingesetzt und bis zur vorletzten Aminosäure synthetisiert. Anschließend wurde das Harz zu gleichen Teilen für MCoTI-N1 und MCoTI-Y1 verwendet und die Synthesen vervollständigt. Nach der Abspaltung vom Harz und ebenso der Rückfaltung erfolgte eine Analyse mittels RP-HPLC und ESI-MS, anschließend erfolgte die präparative HPLC. Die Ausbildung der Disulfidbrücken wurde in Rückfaltungspuffer I durchgeführt. Es wurden 5,5 mg Ausbeute erhalten.

HPLC:  $R_t = 16,8$  min (10→55 in 30 min)

MS ESI m/z: 1587,9[M+2H]<sup>2+</sup> 1058,9[M+3H]<sup>3+</sup>

**4.6.4. oMCoTI-W2**

$\text{C}_{130}\text{H}_{205}\text{N}_{43}\text{O}_{37}\text{S}_6$  [3154,8 g/mol]

Für die manuelle Synthese wurden 150 mg TGR-Harz aus der Synthese des Vorläuferpeptides für oMCoTI-II Variante I eingesetzt und die Synthese des Miniproteins vervollständigt. Nach der Abspaltung vom Harz und ebenso der Rückfaltung erfolgte eine Analyse mittels RP-HPLC und ESI-MS, anschließend erfolgte die präparative HPLC. Die Ausbildung der Disulfidbrücken wurde in Rückfaltungspuffer I durchgeführt. Es wurde 1 mg Ausbeute erhalten.

HPLC:  $R_t = 20,4$  min (10→50 in 30 min)

MS ESI m/z: 1578,4[M+2H]<sup>2+</sup> 1052,6[M+3H]<sup>3+</sup>

**4.6.5. oMCoTI-R5**

$\text{C}_{124}\text{H}_{204}\text{N}_{44}\text{O}_{37}\text{S}_6$  [3095,7 g/mol]

Für die manuelle Synthese wurden 150 mg TGR-Harz aus der Synthese des Vorläuferpeptides für oMCoTI-II Variante I eingesetzt und die Synthese des Miniproteins vervollständigt. Nach der Abspaltung vom Harz und ebenso der Rückfaltung erfolgte eine Analyse mittels RP-HPLC und ESI-MS, anschließend erfolgte die präparative HPLC. Die Ausbildung der Disulfidbrücken wurde in Rückfaltungspuffer I durchgeführt. Es wurden 1,5 mg Ausbeute erhalten.

HPLC:  $R_t = 17,6$  min (10→50 in 30 min)

MS ESI m/z: 1548,9[M+2H]<sup>2+</sup> 1032,9[M+3H]<sup>3+</sup>

**4.6.6. oMCoTI-Q9**

$\text{C}_{123}\text{H}_{200}\text{N}_{42}\text{O}_{38}\text{S}_6$  [3067,6 g/mol]

Für die manuelle Synthese wurden 150 mg TGR-Harz aus der Synthese des Vorläuferpeptides für oMCoTI-II Variante I eingesetzt und die Synthese des Miniproteins vervollständigt. Nach der Abspaltung vom Harz und ebenso der Rückfaltung erfolgte eine Analyse mittels RP-HPLC und ESI-MS, anschließend erfolgte die präparative HPLC. Die Ausbildung der Disulfidbrücken wurde in Rückfaltungspuffer I durchgeführt. Es wurden 6 mg Ausbeute erhalten.

HPLC:  $R_t = 17,1$  min (10→55 in 30 min)

MS ESI m/z: 1534,8[M+2H]<sup>2+</sup> 1023,5[M+3H]<sup>3+</sup>

**4.6.7. oMCoTI-S11**

C<sub>121</sub>H<sub>197</sub>N<sub>39</sub>O<sub>38</sub>S<sub>6</sub> [2998,6 g/mol]

Für die manuelle Synthese wurden 500 mg TGR-Harz eingesetzt und bis zur 17ten Aminosäure synthetisiert. Anschließend wurde das Harz zu gleichen Teilen für oMCoTI-S11, oMCoTI-S12 und oMCoTI-S11/12 verwendet und die Synthese vervollständigt. Nach der Abspaltung vom Harz und ebenso der Rückfaltung erfolgte eine Analyse mittels RP-HPLC und ESI-MS, anschließend erfolgte die präparative HPLC. Die Ausbildung der Disulfidbrücken wurde in Rückfaltungspuffer I durchgeführt. Es wurde 1 mg Ausbeute erhalten.

HPLC:  $R_t = 17,8$  min (10→55 in 30 min)

MS ESI  $m/z$ : 1500,3[M+2H]<sup>2+</sup> 1000,5[M+3H]<sup>3+</sup>

**4.6.8. oMCoTI-S12**

C<sub>121</sub>H<sub>197</sub>N<sub>39</sub>O<sub>38</sub>S<sub>6</sub> [2998,6 g/mol]

Für die manuelle Synthese wurden 500 mg TGR-Harz eingesetzt und bis zur 17ten Aminosäure synthetisiert. Anschließend wurde das Harz zu gleichen Teilen für oMCoTI-S11, oMCoTI-S12 und oMCoTI-S11/12 verwendet und die Synthese vervollständigt. Nach der Abspaltung vom Harz und ebenso der Rückfaltung erfolgte eine Analyse mittels RP-HPLC und ESI-MS, anschließend erfolgte die präparative HPLC. Die Ausbildung der Disulfidbrücken wurde in Rückfaltungspuffer I durchgeführt. Es wurde 1 mg Ausbeute erhalten.

HPLC:  $R_t = 17,4$  min (10→55 in 30 min)

MS ESI  $m/z$ : 1500,3[M+2H]<sup>2+</sup> 1000,5[M+3H]<sup>3+</sup>

**4.6.9. oMCoTI-E15**

C<sub>125</sub>H<sub>206</sub>N<sub>42</sub>O<sub>37</sub>S<sub>6</sub> [3081,7 g/mol]

Für die manuelle Synthese wurden 150 mg TGR-Harz eingesetzt. Nach der Abspaltung vom Harz und ebenso der Rückfaltung erfolgte eine Analyse mittels RP-HPLC und ESI-MS, anschließend erfolgte die präparative HPLC. Die Ausbildung der Disulfidbrücken wurde in Rückfaltungspuffer I durchgeführt. Es wurden 2 mg Ausbeute erhalten.

HPLC:  $R_t = 18,1$  min (10→50 in 30 min)

MS ESI  $m/z$ : 1541,9[M+2H]<sup>2+</sup> 1028,2[M+3H]<sup>3+</sup>

**4.6.10. oMCoTI-S11/S12**

C<sub>118</sub>H<sub>190</sub>N<sub>36</sub>O<sub>39</sub>S<sub>6</sub> [2929,5 g/mol]

Für die manuelle Synthese wurden 500 mg TGR-Harz eingesetzt und bis zur 17ten Aminosäure synthetisiert. Anschließend wurde das Harz zu gleichen Teilen für oMCoTI-S11, oMCoTI-S12 und oMCoTI-S11/12 verwendet und die Synthese vervollständigt. Nach der Abspaltung vom Harz und ebenso der Rückfaltung erfolgte eine Analyse mittels RP-HPLC und ESI-MS, anschließend erfolgte die präparative HPLC. Die Ausbildung der Disulfidbrücken wurde in Rückfaltungspuffer I durchgeführt. Es wurden 1,5 mg Ausbeute erhalten.

HPLC:  $R_t = 18,2$  min (10→55 in 30 min)

MS ESI  $m/z$ : 1465,8[M+2H]<sup>2+</sup> 977,5[M+3H]<sup>3+</sup>

**4.6.11. oMCoTI-R5/D6/R8**

C<sub>122</sub>H<sub>198</sub>N<sub>46</sub>O<sub>39</sub>S<sub>6</sub> [3125,6 g/mol]

Für die manuelle Synthese wurden 150 mg TGR-Harz aus der Synthese des Vorläuferpeptides für oMCoTI-II Variante I eingesetzt und die Synthese des Miniproteins vervollständigt. Nach der Abspaltung vom Harz und ebenso der Rückfaltung erfolgte eine Analyse mittels RP-HPLC und ESI-MS, anschließend erfolgte die präparative HPLC. Die Ausbildung der Disulfidbrücken wurde in Rückfaltungspuffer I durchgeführt. Es wurden 9 mg Ausbeute erhalten.

HPLC:  $R_t = 16,0$  min (10→55 in 30 min)

MS ESI  $m/z$ : 1563,8[M+2H]<sup>2+</sup> 1042,9[M+3H]<sup>3+</sup>

#### 4.7. Bestimmung apparenter $K_i$ 's rational designer MCoTI-II Varianten gegenüber MT-SP1

Bevor die apparenten Inhibitionskonstanten gegenüber Matriptase bestimmt werden konnten, sollte für die chemisch synthetisierten MCoTI-II Varianten ebenso wie bereits für die isolierten MCoTI's die exakte Bestimmung der InhibitorKonzentration durchgeführt werden (Methode 3.5.4). Dies geschah unter der Annahme, dass bei nahezu allen Veränderungen immer noch eine gute Inhibition von Trypsin stattfindet. Daraufhin wurde ebenso die Inhibitionskonstante der einzelnen Varianten gegen Trypsin bestimmt (Methode 3.5.2). Für diese beiden Messungen musste zuvor eine neue Charge an Trypsin titriert werden (Methode 3.5.1.1). Auf dieser Grundlage wurden dann die  $K_{iapp}$ 's gegen Matriptase bestimmt (Methode 3.5.3). Alle Messungen wurden zweimal durchgeführt und der Mittelwert errechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle [4.5] zusammengefasst.

Für alle synthetisierten MCoTI-II Varianten konnte eine gute Inhibition von Trypsin im einstelligen nanomolaren und subnanomolaren Bereich mit Ausnahme von MCoTI-R5/D6/R8 erhalten werden. Diese Variante enthält zu viele Änderungen in der Inhibitorschleife und es ist deshalb möglich, dass dadurch die inhibitorische Aktivität gegenüber Trypsin verloren gegangen ist.

Die Inhibition gegenüber Matriptase liegt für oMCoTI-II im erwarteten dreistelligen nanomolaren Bereich wie für die natürlichen Varianten. Die anderen Varianten oMCoTI-N1, oMCoTI-Y1 und oMCoTI-Q9 zeigen eine etwas schlechtere Inhibition gegenüber MT-SP1. Die Variante oMCoTI-R5 zeigt weniger als 50% Inhibition des natürlichen oMCoTI-II. Die Varianten oMCoTI-W2, oMCoTI-E15 und alle Serinmodifikationen zeigen keinerlei Inhibition im gemessenen Bereich. Ebenso zeigte oMCoTI-R5/D6/R8 keinerlei Inhibition gegen Matriptase.

Tabelle 4.5 Zusammenfassung der  $K_{iapp}$ 's gegen Trypsin und Matriptase aller chemisch synthetisierten MCoTI-II Varianten.

Miniprotein	$K_{iapp}$ Trypsin [nM]	$K_{iapp}$ Matriptase [nM]
oMCoTI-II	0,4	275
oMCoTI-N1	1,9	340
oMCoTI-Y1	0,8	415
oMCoTI-W2	2,4	> 1000
oMCoTI-R5	1,0	580
oMCoTI-Q9	1,1	350
oMCoTI-S11	0,4	> 1000
oMCoTI-S12	0,2	> 1000
oMCoTI-E15	0,4	> 1000
oMCoTI-S11/S12	0,3	> 1000
oMCoTI-R5/D6/R8	> 1000	> 1000

## 4.8. Diskussion II

Im zweiten Abschnitt der Arbeit sollten verschiedene oMCoTI-II Varianten anhand eines Computermodells ausgesucht und chemisch synthetisiert werden. Anschließend sollte die Bestimmung ihrer enzymkinetischen Parameter gegenüber Matriptase erfolgen.

Nachdem der MT-SP1/oMCoTI-II Komplex am Computer erstellt worden war, wurde sorgfältig die Auswahl der einzelnen Varianten getroffen. Dabei sollten in einer ersten Versuchsdurchführung nicht mehr als zehn unterschiedliche Varianten erzeugt werden, da die Festphasensynthese zwar gut funktioniert, aber dennoch sehr zeit- und kostenintensiv ist. So nimmt die manuelle Durchführung der Synthese für ein Peptid mindestens eine Woche in Anspruch. Deshalb wurde bei der Planung der Herstellung der einzelnen Varianten eine parallele Strategie gewählt, soweit dies möglich war.

Zunächst wurde auch die lineare Variante des Miniproteins erzeugt, um die Inhibitionskonstante mit dem natürlichen MCoTI-II zu vergleichen. Das Ergebnis ist, dass die offenkettige Form eine um ca. 50 nM schlechtere Inhibition gegenüber Matriptase aufweist als die zyklische Form. Damit zeigt das Miniprotein dasselbe Verhalten gegenüber Matriptase wie gegenüber Trypsin, bei dem die offenkettige Variante auch eine schlechtere Inhibition zeigt.

Die Bestimmung der Inhibitionskonstanten gegenüber Trypsin ergab für alle Varianten mit Ausnahme der von oMCoTI-R5/D6/R8 Werte im niedrigen nanomolaren und subnanomolaren Bereich. Das Ergebnis entsprach den Erwartungen und zeigt, dass die synthetisierten Varianten das korrekte Faltungsmotiv besitzen. Im nächsten Schritt wurde dann die Inhibition gegen Matriptase bestimmt und es zeigte sich, dass keine der designten Varianten eine bessere Inhibition aufweist als oMCoTI-II. So zeigte oMCoTI-R5 eine erheblich schlechtere Inhibition (580nM), was darauf schließen lässt, dass ein Lysin in P1 Position bevorzugt wird. Das Einfügen von Asparagin oder Tyrosin am N-Terminus von oMCoTI-N1 (340nM) und oMCoTI-Y1 (415nM) anstelle eines Glycin führte zu leicht schlechteren Inhibitionskonstanten, was auf nur einen geringen Einfluss an dieser Stelle für die Inhibition schließen lässt. Jedoch werden kleiner Reste bevorzugt, da die Inhibition von Glycin über Asparagin zu Tyrosin hin abnimmt. Im Gegensatz dazu führte das Einfügen von Tryptophan in oMCoTI-W2 zu einem völligen Verlust der Inhibition gegenüber Matriptase. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es ungünstige Wechselwirkungen mit Phe<sup>99</sup> und Phe<sup>97</sup> der Protease gibt und dadurch die Bindung im aktiven Zentrum nicht mehr möglich ist. oMCoTI-Q9 (350nM) zeigte eine leicht schlechtere Inhibition, was darauf schließen lässt, dass an P3' Position basische Aminosäuren favorisiert werden, aber Lysin wesentlich besser für die Inhibition ist. Jegliche Änderungen von Arg<sup>11</sup> und Arg<sup>12</sup> gegen Serin im Miniprotein führte zum Verlust der Inhibition gegen Matriptase, was bedeutet, dass das Vorhandensein der positiv geladenen basischen Aminosäuren offenbar gegenüber negativ geladenen Seitenketten zu einer besseren Inhibition des Enzyms beiträgt. Auch die Variante oMCoTI-E15 zeigte keine Inhibition gegenüber Matriptase, so dass auch hier entgegen des Designs keine Stabilisierung der Bindung über die Wechselwirkung mit Arg<sup>60</sup>C des Proteaserückgrats erfolgt. Die Variante oMCoTI-R5/D6/R8 zeigte bei Matriptase ebenfalls keine Inhibition. Das Übernehmen der P1' bis P4' Aminosäuren aus der Eglin C Inhibitorvariante brachte ebenfalls keinen Erfolg.

Zusammenfassend bleibt für das rationale Design festzuhalten, dass es durch Anwendung eines einfachen Dockingverfahrens nicht gelang, Varianten mit verbesserter Bindung von Matriptase zu erhalten. Die Erfolgchancen würden sich wahrscheinlich erhöhen, wenn es gelänge, einen Co-Komplex von MCoTI-II und Matriptase zu erhalten und auf dieser Basis Modellierungsstudien unter Einbeziehung von Moleküldynamik und Energieminimierungen durchzuführen.



## 4.9. Erstellung kombinatorischer oMCoTI-II Bibliotheken

Im dritten Abschnitt dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es möglich ist, durch die Anwendung von Verfahren der gerichteten Evolution oMCoTI-II Varianten zu finden die eine bessere Inhibitionskonstante gegen Matriptase aufweisen. Dazu war es zuerst nötig die entsprechende Bibliothek herzustellen. Es wurden zwei verschiedene Ansätze für das Bibliotheksdesign gewählt. In der ersten Bibliothek wurde die Inhibitorschleife komplett randomisiert. In der zweiten Bibliothek wurde eine Randomisierung gewählt, die auf Trypsin ähnliche Proteasen optimiert war.

### 4.9.1. MCoTI Bibliothek I

Das Design der ersten Bibliothek berücksichtigte bei der Randomisierung insgesamt zehn ausgewählte Positionen im Miniprotein [Abb. 4.9]. Die grün markierten Aminosäuren sind komplett randomisiert mit Ausnahme von Cystein, die blau markierten Position sind jeweils zu 50% konstant gehalten und das Prolin in der Inhibitorschleife ist nur in 10% alle Fälle mit einer anderen Aminosäure randomisiert, da es essentiell für die Faltung des Miniproteins ist.<sup>[240]</sup> Um dieses Design zu ermöglichen war es nötig die randomisierten Oligodesoxyribonucleotide für die PCR als Trimere zu synthetisieren, was von der Firma Ella Biotech durchgeführt wurde.<sup>[241]</sup>

Für die Erstellung der Bibliothek wurde zunächst eine PCR (Methode 3.3.2) mit 1 pmol der beiden Oligodesoxyribonucleotiden FixIIB\_up und CoTI\_VarII\_Liblo 10 Zyklen lang bei 52°C Annealingtemperatur und 30 Sekunden Elongation ohne ein Templat durchgeführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 pmol VarI\_up und erneut CoTI\_VarII\_Liblo für weitere 20 Zyklen. Das PCR Produkt wurde aufgereinigt (Methode 3.2.4) und diente als Templat für die Bibliothek. Für die jeweiligen Transformationen von *S. cerevisiae* war es nötig, dieses Templat mit den Oligonucleotiden für die Homologe Rekombination zu amplifizieren. Dazu wurden in jeweils in mehreren Ansätzen die Oligodesoxynucleotide MC\_slo\_ysc\_up und McoTI\_Ysc2\_lib\_lo bei 52°C Annealingtemperatur und 30 Sekunden Elongation verwendet (Methode 3.3.2). Anschließend erfolgte die Aufreinigung (Methode 3.2.4) und Bestimmung der DNA Konzentration (Methode 3.2.3).

Im zweiten Schritt wurde das Plasmid pCT EGFR (Material 2.2.2) transformiert (Methode 3.1.5) und anschließend wurden positive Kolonien in der entsprechenden Menge dYT Medium angezogen und eine Minipräparation (Methode 3.2.5.1) oder Midipräparation (Methode 3.2.5.2) zur Isolierung ausreichender Menge an Plasmid DNA wurde durchgeführt. Nach Bestimmung der DNA Konzentration (Methode 3.2.3) wurde das Plasmid mit BamHI und NheI gespalten (Methode 3.3.1). Dabei zerfällt das Plasmid in zwei Teile, einen ca. 1500 bp und einen ca. 5000 bp großen Teil.

**NH<sub>2</sub>-GVC**PKILKK**CRRDSDCPGACICRGNGYCG-COOH**

- **Rot**      Originalcodon mit 10% Gemisch von 19 AA (-Cys)
- **Blau**     Originalcodon mit 50% Gemisch von 19 AA (-Cys)
- **Grün**    randomisiert mit 19 AA's außer Cys

Abbildung 4.9 Design der MCoTI Bibliothek I. Grün: komplett randomisierte Positionen mit Ausnahme von Cystein. Blau: zu 50% randomisierte Positionen ohne Cystein. Rot: zu 10% randomisierte Position ohne Cystein.

Der Verdau des Plasmides wurde auf ein Agarosegel aufgetragen (Methode 3.2.2) und das 5000 Basenpaare große Fragment wird aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt (Methode 3.2.4) und die Konzentration bestimmt. Nachdem das Insert und der Vektor für die MCoTI Bibliothek vorbereitet sind, wurde die Transformation des Hefestammes EBY100 nach der Methode von Chao et al. durchgeführt<sup>[215]</sup> (Methode 3.1.6). Dabei wurden 1  $\mu\text{g}$  Vektor und 5  $\mu\text{g}$  Insert eingesetzt. Als Kontrolle diente eine Elektroporation die nur dem geschnittenen Plasmid durchgeführt wurde. Die Verdünnungsplattierungen ergaben eine Transformationseffizienz von bis zu  $5 \cdot 10^5$  pro  $\mu\text{g}$  Plasmid DNA. Es wurden maximal vier Transformationen gleichzeitig durchgeführt, so dass mehrere Wiederholungen des Ablaufes nötig waren, bis eine Bibliotheksgröße von ca.  $1 \times 10^7$  verschiedenen Hefezellen erreicht wurde.

Die hergestellten Transformanten wurden im Gegensatz zur Herstellung von Bibliotheken in *E. coli* nicht ausplattiert sondern in selektivem SDCAA Medium angezogen. Nach zwei Tagen wurde die Zelldichte bestimmt (Methode 3.1.4) und eine erneute Flüssigkultur SDCAA Medium über Nacht inokuliert. Aus dieser wurde eine erneute Flüssigkultur in low-SDCAA Medium drei Tage lang bei 30°C im Schüttler inkubiert und anschließend dann daraus die Glycerolstocks in mehreren Aliquots von mindestens  $10^9$  Zellen für die langfristige Lagerung der Bibliotheken bei -80°C angesetzt (Methode 3.1.3).

Zur Überprüfung, ob die homologe Rekombination des MCoTI Konstruktes in den Vektor erfolgreich verlaufen war, wurde nach jedem Transformationstag eine Kolonie PCR mit mehreren Hefezellen durchgeführt (Methode 3.3.4). Diese wurden dazu mit *Yeast Lytic Enzyme* inkubiert und anschließend direkt für eine PCR mit den Oligodesoxynucleotiden MC\_slo\_ysc\_up und CoTI\_VarII\_Liblo eingesetzt (Methode 3.3.2). Als Positivkontrolle wurde der Vektor pCT-ocMCoTI-II verwendet [Abb. 4.10]. Nachdem für alle untersuchten Klone eine erfolgreiche Etablierung des McoTI-Gens in der Hefe nachgewiesen war, erfolgte eine weitere Validierung der Bibliotheken.

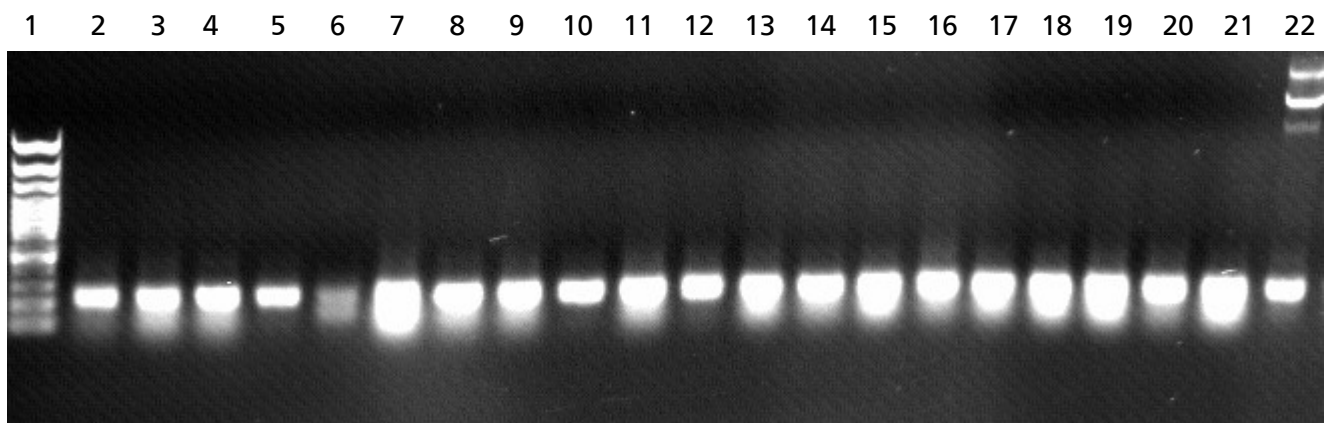


Abbildung 4.10 Beispiel einer Kolonie PCR zur Überprüfung der homologen Rekombination in *Saccharomyces cerevisiae*. 19 von 20 aufgetragenen Kolonien zeigten ein eindeutig positives Ergebnis. 1 Lambda DNA/*Eco47I* Marker. 2-21 einzelne Kolonien der Verdünnungsplattierungen. 22 Positivkontrolle pCT-ocMCoTI-II.

Die weitere Validierung der Bibliothek erfolgte durch Bestimmung einzelner Sequenzen der McoTI-Gene aus den Verdünnungsplattierungen. Dazu wurden diese in 5 mL SDCAA Medium ü.N bei 30°C inkubiert und am nächsten Morgen mit Hilfe von *Yeast Lytic Enzyme* die Zellwand verdaut (Methode 3.2.6). Anschließend erfolgte die Isolierung der Plasmid DNA mittels einer Minipräparation (Methode 3.2.5.1).

Mit den erhaltenen Plasmiden wurde eine Retransformation in *E.coli* durchgeführt (Methode 3.1.5). Die auf Ampicillinresistenz selektierten Bakterien wurden einer Kolonie-PCR unterzogen (Methode 3.3.3). Als Oligodesoxynucleotiden wurden ebenfalls wie bei *S. cerevisiae* MC\_slo\_ysc\_up und CoTI\_VarII\_Liblo eingesetzt. Die positiven Bakterien wurden in 5 mL dYT ü.N bei 37°C inkubiert und anschließend erfolgte die Isolierung (Methode 3.2.5.1) und Konzentrationsbestimmung des Plasmids (Methode 3.2.3). Die erhaltene DNA wurde zusammen mit dem Oligodesoxynucleotiden pCT\_Seq\_lo oder pCT Seq\_up zur Bestimmung der Sequenz zur Firma Seqlab geschickt.

Für zehn Plasmide ergab sich die erwartete Verteilung der verschiedenen Aminosäuren an den randomisierten Positionen im Miniprotein [Abb. 4.11]. Daraufhin wurde auf weitere Sequenzierungen verzichtet und die Bibliothek für die Durchmusterung gegen MT-SP1 eingesetzt.



Abbildung 4.11 Verteilung der randomisierten Position in MCoTI-II. Aminosäuren mit aliphatischen und aromatischen Seitenketten (grün), mit Carboxyl Seitenketten (rot), mit basischen Seitenketten (blau) und schwarz dargestellt restliche Aminosäuren. Die Höhe der Buchstaben stellt graphisch die Häufigkeit dar, mit der die jeweiligen Aminosäuren an den jeweiligen Positionen angetroffen werden. Erstellt mit <sup>[242]</sup>

#### 4.9.2. MCoTI Bibliothek II

Das Design der zweiten Bibliothek ist im Gegensatz zur ersten Bibliothek spezifisch für Trypsin ähnliche Serinproteasen [Abb. 4.12]. Dazu wird in der Inhibitorschleife das Codon für Prolin nicht variiert und das Lysin (rot), welches in die S1 Tasche der Protease ragt nur mit Arginin im Verhältnis 1:1 randomisiert. Die restlichen Aminosäuren der Inhibitorschleife (grün) sind mit Ausnahme von Cystein komplett randomisiert. Die benachbarten Aminosäuren der Inhibitionssequenz sind in dieser Bibliothek zu 50% randomisiert. Auch wurden bei dieser Bibliothek weitaus mehr Stellen ausgewählt die für eine Randomisierung in Frage kommen. So wurden die beiden Aspartate der  $3_{10}$  Helix und die Aminosäuren der ersten Schleife ebenfalls zu 10% randomisiert. Diese komplexe kombinatorische Bibliothek wurde von der Firma Sloning (heute Morphosys) mit Hilfe der Slonomics® Technologie durchgeführt. Dabei werden vorgefertigte doppelsträngige Trimere eingesetzt, die als Bausteine für eine mehrfache parallele Gensynthese benutzt werden und somit die Bibliothek erzeugen.

Die Erstellung der MCoTI Bibliothek II erfolgte im Arbeitskreis durch Dipl. Biol. Bernhard Glotzbach. Das von Sloning erhaltene randomisierte MCoTI-II Gen wurde in mehreren Ansätzen mit den Oligodesoxynucleotiden MC\_slo\_ysc\_up und McoTI\_Ysc2\_lib\_lo bei 52°C Annealingtemperatur und 30 Sekunden Elongation amplifiziert (Methode 3.3.2), anschließend erfolgte die Aufreinigung (Methode 3.2.4) und Bestimmung der DNA Konzentration (Methode 3.2.3). Als Vektor für die Erstellung der Bibliothek in *S. cerevisiae* diente ebenfalls pCT-EGFR, der wie in Abschnitt 4.9.1 beschrieben für die Transformation präpariert wurde.

Die Transformation der Hefezellen wurde dieses Mal nach dem Protokoll von Benatuil et al. durchgeführt (Methode 3.1.6), da mit dieser Versuchsanordnung höhere Transformationseffizienzen beschrieben worden sind.<sup>[211]</sup> Das Auszählen der Verdünnungsplattierungen ergab, dass insgesamt  $2 \times 10^7$  Transformanten mit vier Elektroporationen erhalten wurden. Die Transformationseffizienz betrug  $5 \times 10^6$  Zellen pro  $\mu\text{g}$  Plasmid. Die hergestellte MCoTI Bibliothek II wurde ebenfalls nach der Elektroporation in selektivem SDCAA Medium angezogen. Nach zwei Tagen wurde die Zelldichte bestimmt (Methode 3.1.4) und eine erneute Flüssigkultur SDCAA Medium über Nacht inokuliert. Aus dieser wurde eine erneute Flüssigkultur in low-SDCAA Medium drei Tage lang bei  $30^\circ\text{C}$  im Schüttler inkubiert und anschließend dann daraus die Glycerolstocks in mehreren Aliquots von mindestens  $10^9$  Zellen für die langfristige Lagerung der Bibliothek angesetzt (Methode 3.1.3).

Auf eine Validierung durch Sequenzierung der MCoTI Bibliothek II wurde verzichtet, da dieses bereits von der Firma Sloning selbst mit tausenden von Sequenzen durchgeführt wurde und eine den Vorgaben entsprechende Verteilung der Aminosäuren an den randomisierten Positionen erhalten wurde (Daten nicht gezeigt).

**$\text{NH}_2$ -SGVCPKILKKCRRDSDCPGACICRGNGYCG-COOH**

- **Rot**     Arginin oder Lysin
- **Blau**    Originalcodon mit 50% Gemisch von 19 AA (-Cys)
- **Grün**    randomisiert mit 19 AA's außer Cys
- **Orange** Originalcodon mit 10% Gemisch von 19 AA (-Cys)

Abbildung 4.7 Design der MCoTI Bibliothek II Rot: Lysin oder Arginin. Grün: Komplet randomisierte Positionen ohne Cystein. Blau: 50% randomisierte Positionen. Orange: 10% randomisierte Positionen.

#### 4.10. Durchmusterung von oMCoTI-II Bibliotheken mittels *Yeast Surface Display*

Nachdem die beiden Bibliotheken erstellt worden waren, sollte im nächsten Schritt mittels *yeast surface display* die Suche nach neuen Inhibitoren gegen MT-SP1 stattfinden. Die Durchmusterung sollte zunächst durch eine Vorselektion über magnetische Beads stattfinden, um die Größe der Bibliothek zu verringern und damit schnellere Anreicherungen in den anschließenden FACS Sortierungen zu ermöglichen. Bevor jedoch damit begonnen werden konnte, musste zuerst die optimale Induktionstemperatur und -dauer für die Expression des Zelloberflächen-präsentierten Aga2p-MCoTI Fusionprotein bestimmt werden. Dazu wurde der Vektor pCT-ocMCoTI-II in *S. cerevisiae* nach Chao et al. transformiert (Methode 3.1.6) und auf SDCAA Platten ausgestrichen.<sup>[215]</sup> Anschließend wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt um zu überprüfen welche Zelle den Vektor enthält (Methode 3.3.4). Die positiven Zellen wurden in 5 mL SDCAA Medium ü.N. bei 30°C inokuliert. Anschließend wurde die Zelldichte bestimmt (Methode 3.1.4) und jeweils 5 mL SGCAA Medium mit einer OD<sub>600</sub> von 1 bei 20°C, 25°C, 30°C und 37°C. inkubiert. Nach einem, zwei, drei und fünf Tagen wurden Aliquots von 10<sup>6</sup> Zellen, das entspricht einer OD<sub>600</sub> von 0,1, entnommen und mit einem anti myc Antikörper, sowie anti-Maus FITC-Antikörper fluoreszenzmarkiert (Methode 3.6.1). Nach der Färbung wurden im FACS die einzelnen Fluoreszenzintensitäten miteinander verglichen (Methode 3.6.2). Von der Fluoreszenzintensität kann durch das im MCoTI-II Konstrukt enthaltene Myc-Epitop auf die Oberflächenexpression zurückgeschlossen werden und anhand derer die optimale Induktionszeit und -temperatur bestimmt werden.

Für die Induktion bei 20°C wurde erst nach 5 Tagen eine nennenswerte Expression von MCoTI-II beobachtet. Für die Induktion bei 37°C Grad war nach einem Tag eine gute Expression von 20% aller Zellen zu erkennen, allerdings zeigten bei den später folgenden Messungen die Hefezellen keine Expression mehr. Für die beiden Induktionen bei 25°C und 30°C zeigten nach dem ersten Tag ca. 10% aller Zellen Expression von MCoTI-II. Nach dem zweiten Tag zeigte sich eine deutliche zweite Population für beide Induktionstemperaturen, wobei der prozentuale Anteil der Oberflächenexpression bei 25°C über dem der Induktion bei 30°C lag. Für die folgenden Experimente wurden 25°C über 2 Tage als Induktionsbedingungen gewählt [Abb. 4.13].

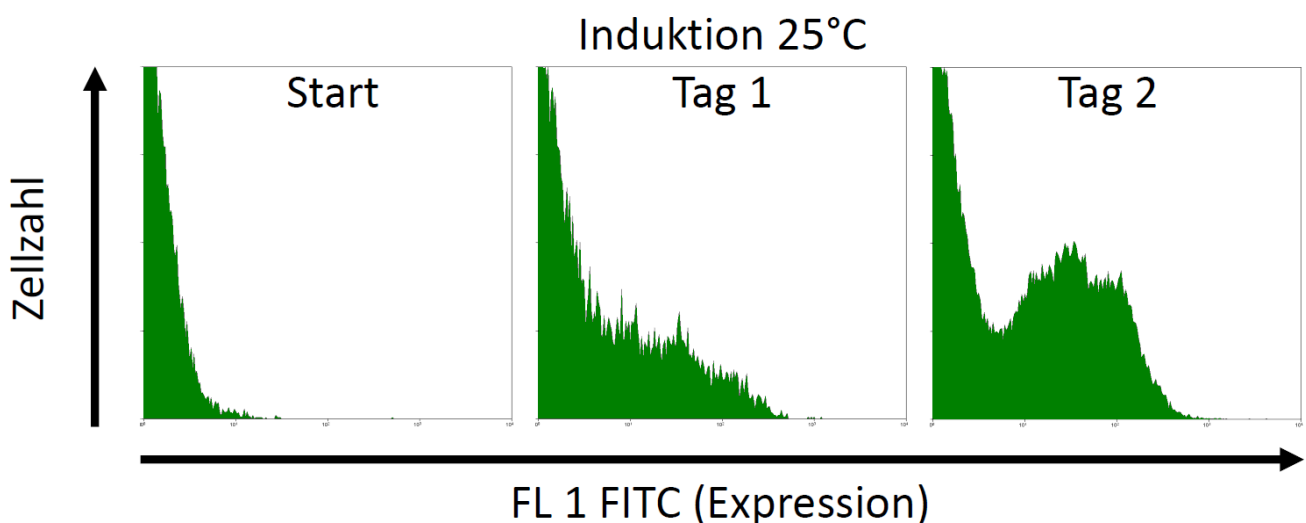


Abbildung 4.13 Histogramme für die Induktion bei 25°C, unmittelbar vor der Induktion (Start), nach einem Tag (Tag1), sowie nach zwei Tagen (Tag2). Auf der Y-Achse ist die Anzahl der Zellen aufgetragen, auf der X-Achse die Fluoreszenzintensität des FITC markierten anti myc Antikörpers. Eine deutliche Zunahme der Oberflächenexpression ist nach zwei Tagen zu erkennen.

MCoTI-II zeigt bereits eine Bindung an Matriptase wie in Abschnitt 4.3.2 gezeigt werden konnte. Um zu überprüfen, ob FACS Bedingungen gefunden werden können, die es erlauben zwischen schwach und stark bindenden Varianten zu unterscheiden, wurde eine Doppelfärbung der Zellen durchgeführt. Dabei wurde im FITC Kanal die Anwesenheit des Myc-Epitops durch Verwendung eines anti Myc und anti-Maus FITC-Antikörper nachgewiesen, während im PE Kanal durch Phycoerythrin, welches an Streptavidin (SAPE) gebunden ist, die Bindung des biotinylierten Enzyms, Trypsin oder Matriptase, nachgewiesen wurde.

Dazu wurden die beiden Proteasen Trypsin und Matriptase biotinyliert (Methode 3.4.11). Als Referenz wurde ein Hefeklon verwendet, der MCoTI-Wildtyp präsentiert. Dieser wurde in 5mL SDCAA Medium ü.N. bei 30°C inokuliert. Anschließend wurde die Expression des Aga2p-MCoTI-Fusionsproteins unter den herausgefundenen optimalen Bedingungen für 2 Tage bei 25°C in 5mL SGCAA Medium induziert. Nachdem Ende der Induktionszeit wurden erneut die Zelldichte bestimmt und drei Aliquots von  $5 \cdot 10^6$  Zellen erstellt. Die erste Probe wurde nur mit SAPE und anti Maus FITC Antikörper fluoreszenzmarkiert (Methode 3.6.1) und diente als Negativkontrolle. Die anderen beiden Proben wurden zunächst 30 Minuten mit jeweils 50µL Trypsin (1µM) oder Matriptase (1µM) auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von anti-myc Antikörper und SAPE (Methode 3.6.1). Nachdem die Proben für die Messungen vorbereitet worden waren, wurden sie im FACS gemessen (Methode 3.6.2). Der anti-Maus FITC Antikörper und SAPE zeigten in der Negativkontrolle keine unspezifischen Wechselwirkungen mit der Hefekultur, was daran zu erkennen ist, dass sich eine kompakte Verteilung der Population im Bereich geringer Fluoreszenz ergibt. Die geringe Fluoreszenz bis  $10^1$  ist auf die Autofluoreszenz der eingesetzten Zellen zurückzuführen. Für Trypsin und Matriptase zeigte sich eine zweite Population im Fluoreszenzkanal 1 durch die Markierung mit dem anti-myc und anti-Maus FITC Antikörper. Im Fluoreszenzkanal 2 ist ein deutlicher Unterschied der beiden Population die MCoTI-II auf der Zelloberfläche präsentieren zu erkennen [Abb. 4.14]. Durch die niedrigere Inhibitionskonstante des Miniproteins gegenüber Trypsin (0,4 nM) im Vergleich zu Matriptase (275 nM), bleiben mehr Proteasemoleküle an der Zelloberfläche gebunden und ergeben somit auch eine höher Fluoreszenzintensität. Somit ist es möglich hochaffine Proteaseinhibitoren von niedrig affinen zu unterscheiden.

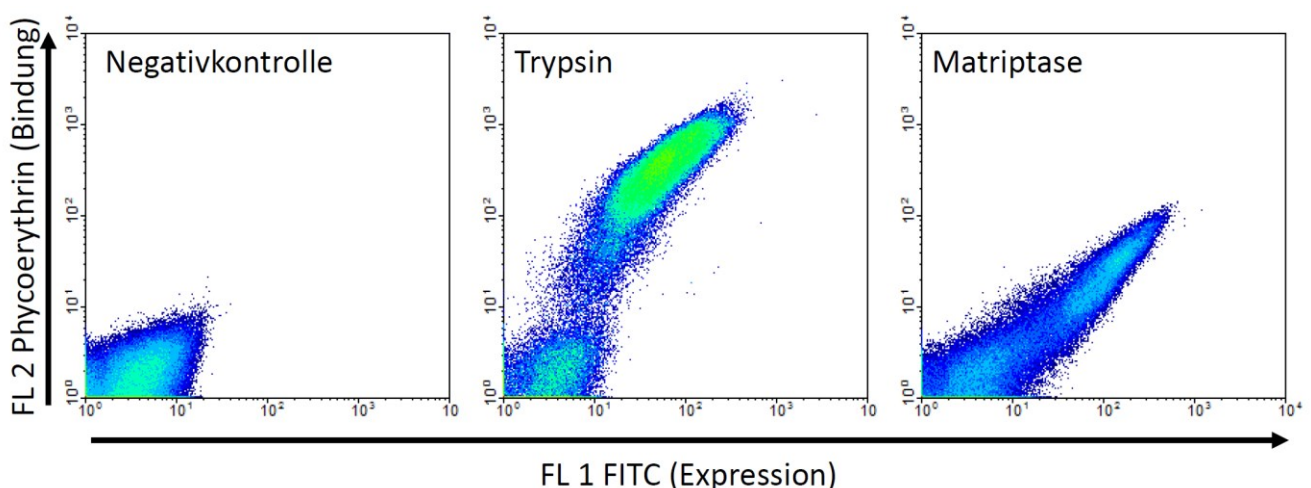


Abbildung 4.14 Zweidimensionale Darstellung der FACS Analyse. Auf der Y-Achse aufgetragen ist die Fluoreszenz von PE, die Rückschlüsse über die Bindung der Protease zulässt. Auf der X-Achse aufgetragen die Fluoreszenz von FITC, das die Zellen anzeigt, die Miniproteine auf der Zelloberfläche präsentieren. Links, Negativkontrolle die nur mit SAPE gefärbt wurde. Mitte, Zellen die mit 1 µM Trypsin und anti-myc Antikörper gefärbt wurden. Rechts, Zellen die mit 1 µM Matriptase und anti-myc Antikörper gefärbt wurden.



#### 4.10.1. MACS Vorselektion der Bibliotheken

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich hochaffine Inhibitoren auf der Hefeoberfläche und im FACS darstellen lassen, wurde mit den Selektionen gegen Matriptase begonnen. Um sicher zu stellen, dass die volle Diversität der Bibliothek genutzt wird, musste mindestens ein zehnfacher Überschuss (ca.  $2 \times 10^8$  Zellen) durchmustert werden. Dazu sollten zunächst die Bibliotheken einer Vorselektion mit Magnetobeads unterzogen werden. Die MACS Selektion hat den Vorteil, dass sie weniger zeitintensiv als eine FACS Selektion ist und es auch ermöglicht größere Bibliotheken ( $>10^8$  Zellen) zu durchmustern. In einem ersten Ansatz sollte die MCoTI Bibliothek I gegen die beiden Proteasen Trypsin und Matriptase selektiert werden, damit diese, nachdem die Diversität verringert wurde in weiteren Runden im FACS sortiert werden können

Zunächst wurde dazu die als Glycerolstock gelagerte Bibliothek in 200 mL SDCAA inokuliert und ein weiteres Mal in SDCAA passagiert. Daraus wurden dann  $10^9$  Zellen entnommen und in 100 mL SGCAA bei 25°C induziert. Nach zwei Tagen wurden dann jeweils  $5 \times 10^8$  Zellen für die MACS Selektion eingesetzt und ein Aliquot mit anti Myc und anti-Maus FITC Antikörper fluoreszenzmarkiert (Methode 3.6.1) und im FACS gemessen (Methode 3.6.2) um die Induktion zu überprüfen. Die mit Streptavidin versehenen Magnetobeads wurden mit den jeweils  $1 \mu\text{M}$  biotinylierten Proteasen gekoppelt und anschließend die Hefezellen dazu gegeben und für zehn Minuten inkubiert (Methode 3.6.3). Nach mehreren Waschschritten wurden die Zellen samt Magnetobeads in 5 mL SDCAA inokuliert und für zwei Tage anwachsen gelassen. Es wurden auch Verdünnungsplattierungen ausgestrichen, diese ergab, dass für Trypsin  $6 \times 10^5$  Zellen und für Matriptase  $3 \times 10^5$  Zellen gebunden hatten, was ca. 0,1% aller eingesetzten Zellen entsprach. Nachdem die selektierten Zellen wieder angewachsen waren, wurden sie einmal in 50 mL SDCAA Medium passagiert und anschließend mit einem Teil davon eine neue Induktion in 5 mL SGCAA Medium inokuliert. Diese wurden nach drei Tagen wiederum mit anti myc und anti-Maus FITC Antikörper fluoreszenzmarkiert (Methode 3.6.1), um zu überprüfen ob sich Zellen angereichert hatten die verschiedene MCoTI Varianten präsentieren. Die FACS Messung (Methode 3.6.2) ergab jedoch, dass keine Zunahme der Expression für beide Proteasen nach der MACS Selektion zu erkennen war [Abb. 4.15].

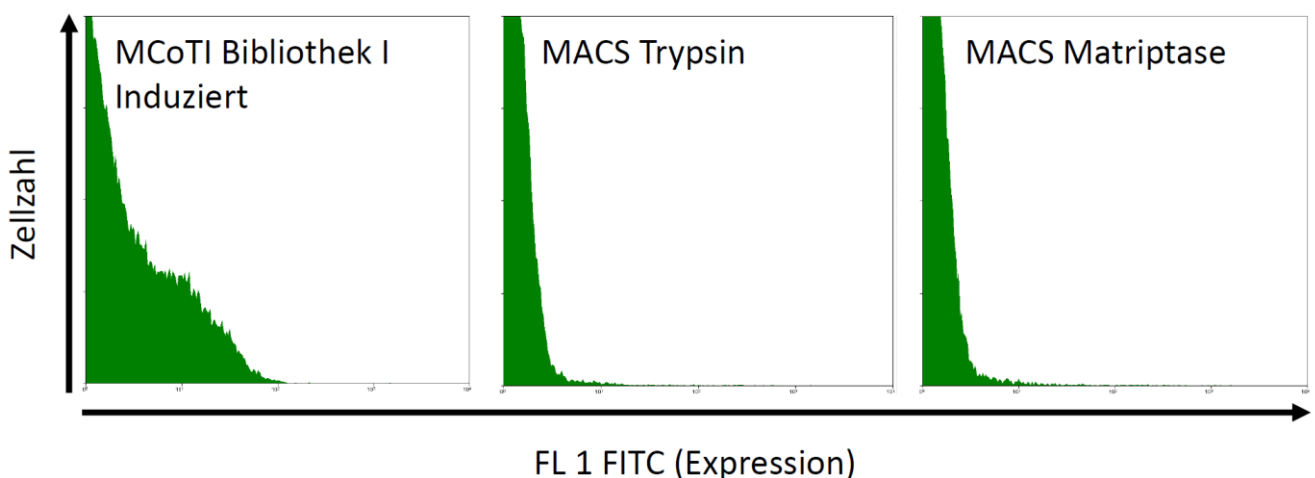


Abbildung 4.8 Histogramme der im MACS selektierten MCoTI Bibliothek I gegen Trypsin und MT-SP1. Links, induzierte Bibliothek wie sie in der Selektion eingesetzt wurde. Mitte, Ergebnis der re-induzierten Bibliothek nach der Selektion gegen Trypsin. Rechts, Ergebnis der re-induzierten Bibliothek nach der Selektion gegen Matriptase

#### 4.10.2. FACS Durchmusterung der MCoTI Bibliothek I

Nachdem in der MACS Selektion keine Zellen angereichert werden konnten, die Miniproteine auf der Oberfläche präsentieren, wurde beschlossen die Bibliotheken direkt im FACS zu selektieren. Dazu wurde ein Aliquot der Glycerolstocks der MCoTI Bibliothek I in 200 mL SDCAA Medium inokuliert und anschließend ein weiteres Mal in SDCAA Medium passagiert. Daraus wurden 50 mL SGCAA auf eine  $OD_{600}$  1 eingestellt und die Induktion für zwei Tage bei 25°C durchgeführt. Nach der Induktion wurde wieder die Zelldichte bestimmt und  $1 \times 10^8$  Zellen für die Sortierung entnommen. Ebenfalls wurden zwei weitere Aliquots von  $1 \times 10^6$  Zellen für die Negativ- und Positivkontrolle entnommen. Als Negativkontrolle wurde eine Fluoreszenzmarkierung mit Streptavidin-Phycoerythrin durchgeführt und als Positivkontrolle eine Markierung mit anti-myc Antikörper (Methode 3.6.1).

Die Zellen aus der Bibliothek wurden in einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ L biotinylierter Matriptase (1 $\mu$ M) 30 Minuten lang auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmarkierung mit Phycoerythrin und FITC (Methode 3.6.1). Die markierten Zellen wurden anschließend im FACS sortiert (Methode 3.6.2). Dazu wurden zuerst die Kontrollen durchgeführt. Als nächstes wurde eine Probe mit 15000 Zellen detektiert, um das Sortierfenster richtig einzustellen. In der ersten Runde wurde das Fenster so gelegt das ca. 0,1% aller Zellen sortiert werden sollten [Abb. 4.16]. Anschließend erfolgte die Sortierung von  $10^8$  Zellen. Die sortierten Zellen wurden in 1 mL SDCAA gesammelt und nach der Prozedur in 5mL SDCAA überführt und zwei Tage bei 30°C wieder anwachsen gelassen. Danach wurden die Zellen einmal in 5 mL SDCAA Medium passagiert und anschließend aus einem Teil Glycerolstocks in low-SDCAA Medium angefertigt und mit dem anderen Teil 5 mL SGCAA auf eine  $OD_{600}$  1 eingestellt und erneut die Induktion für die zweite Sortierrunde gestartet.

Von den erneut induzierten Zellen wurde die  $OD_{600}$  bestimmt und  $1 \times 10^7$  Zellen für die zweite Sortierung aliquotiert, ebenso wurden für die beiden Kontrollen wieder  $1 \times 10^6$  Zellen entnommen. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmarkierung mit der gleichen Konzentration an Matriptase (1 $\mu$ M) und unter denselben Bedingungen um zu erkennen, ob eine Population angereichert wurde, die Bindung an die Protease zeigt (Methode 3.6.1). Es folgte die Messung der Kontrollen und eine Messung einer kleinen Probe zur Feststellung des Sortierfensters und der gesamten Bibliothek (Methode 3.6.2). Die sortierten Zellen wurden in 1 mL SDCAA Medium gesammelt und in 5 mL SDCAA Medium zwei Tage anwachsen lassen. Anschließend wurden die Zellen in SDCAA passagiert und danach für Glycerolstocks und die nächste Induktion aufgeteilt.

Die Durchführung der dritten Runde und vierten Runde erfolgten analog zur zweiten Runde. Es wurden lediglich die Konzentrationen der Protease über 500 nM auf 100 nM verringert [Tab. 4.6]. Nach der vierten Runde wurden keine weiteren Selektionen mehr durchgeführt und die einzelnen Runden einer genaueren Analyse unterzogen.

Tabelle 4.6 Zusammenfassung der Proteasekonzentration, eingesetzten und selektierten Zellen für die einzelnen Selektionsrunden der MCoTI Bibliothek I

Selektionsrunde	Matriptasekonzentration	Eingesetzte Zellen	Sortierte Zellen
Runde 1	1 $\mu$ M	$1 \times 10^8$	$1,0 \times 10^5$ (0,1%)
Runde 2	1 $\mu$ M	$1 \times 10^7$	$5,0 \times 10^4$ (0,5%)
Runde 3	500 nM	$6 \times 10^6$	$1,9 \times 10^4$ (0,3%)
Runde 4	100 nM	$8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^4$ (0,2%)



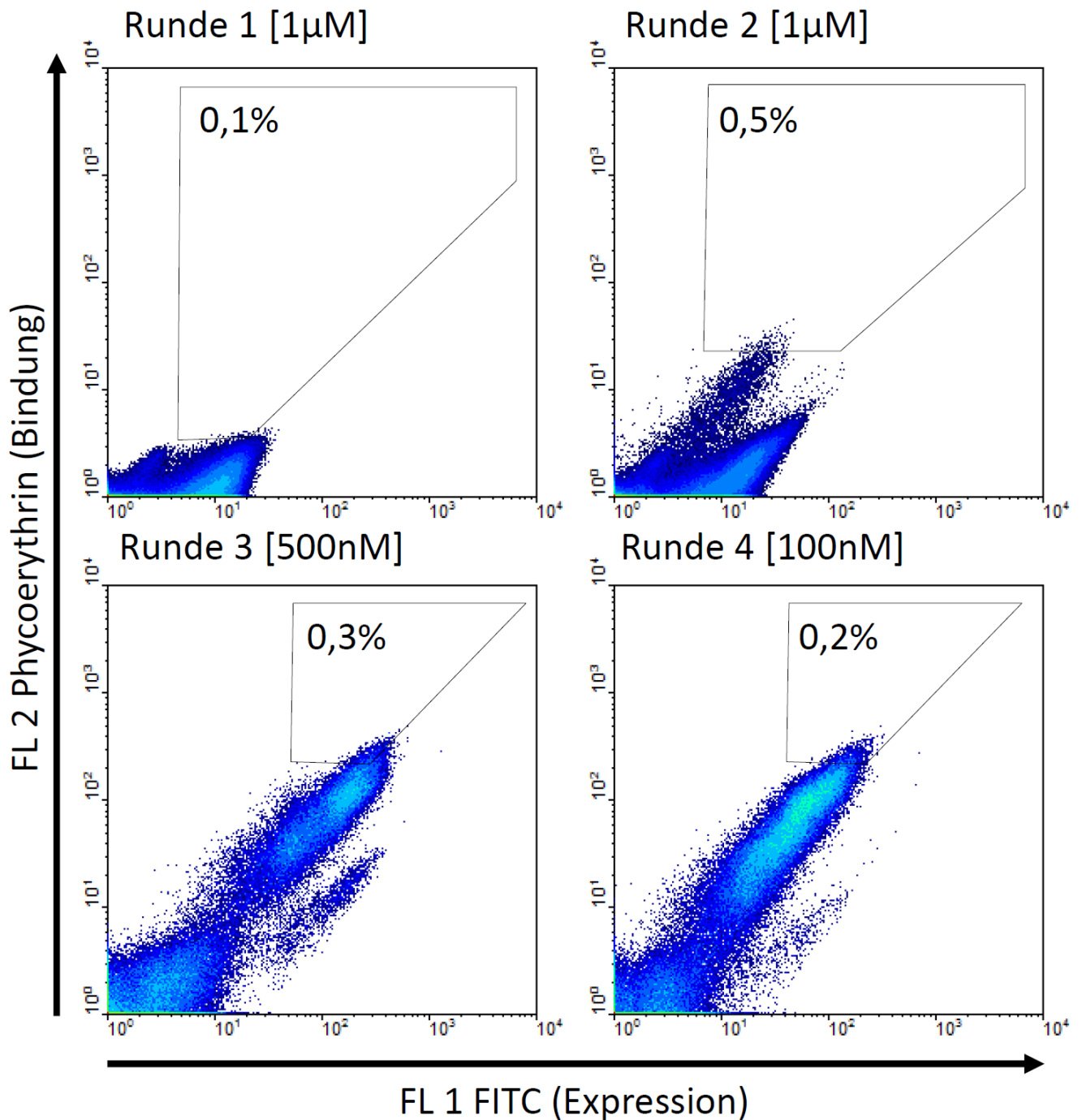


Abbildung 4.9 Zweidimensionale Darstellung der einzelnen Selektionsrunden für die MCoTI Bibliothek I. Die Y-Achse zeigt logarithmisch die Fluoreszenz von Phycoerythrin an, welches an die Protease gekoppelt ist und damit ein Nachweis für die Bindung ist. Die X-Achse zeigt logarithmisch die Fluoreszenz von FITC an, welches über zwei Antikörper an das Myc-Mpitop gebunden ist und damit ein Nachweis für die Expression ist. Oben links dargestellt die mit  $1\mu\text{M}$  MT-SP1 markierten Zellen vor der ersten Runde, mit dem Sortierfenster für 0,1% der Population. Oben rechts dargestellt die mit  $1\mu\text{M}$  MT-SP1 markierten Zellen vor der zweiten Runde, mit dem Sortierfenster für 0,5% der Population. Unten links dargestellt die mit 500nM MT-SP1 markierten Zellen vor der dritten Runde, mit dem Sortierfenster für 0,3% der Population. Unten rechts dargestellt die mit 100nM MT-SP1 markierten Zellen vor der vierten Runde, mit dem Sortierfenster für 0,2% der Population.

#### 4.10.3. FACS Durchmusterung der MCoTI Bibliothek II

Im Anschluss an die Selektion der MCoTI Bibliothek I wurde die auf trypsinähnliche Serinproteasen optimierte MCoTI Bibliothek II nach potenziellen Matriptaseinhibitoren durchmustert. Dazu wurde ein Aliquot der Glycerolstocks der MCoTI Bibliothek II in 200 mL SDCAA Medium inokuliert und anschließend ein weiteres Mal in SDCAA Medium passagiert. Daraus wurden 50 mL SGCAA auf eine  $OD_{600}$  1 eingestellt und die Induktion für zwei Tage bei 25°C durchgeführt. Nach der Induktion wurde wieder die Zelldichte bestimmt und  $3 \times 10^8$  Zellen für die Sortierung entnommen. Ebenfalls wurden zwei weitere Aliquots von  $1 \times 10^6$  Zellen für die Negativ- und Positivkontrolle entnommen. Als Negativkontrolle wurde eine Fluoreszenzmarkierung mit Streptavidin-Phycoerythrin durchgeführt und als Positivkontrolle eine Markierung mit anti-myc Antikörper (Methode 3.6.1).

Die Zellen aus der Bibliothek wurden in einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ L biotinylierter Matriptase (500nM) 30 Minuten lang auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmarkierung mit Phycoerythrin und FITC (Methode 3.6.1). Die markierten Zellen wurden anschließend im FACS sortiert (Methode 3.6.2). Dazu wurden zuerst die Kontrollen durchgeführt. Als nächstes wurde eine Probe mit 15000 Zellen detektiert, um das Sortierfenster richtig einzustellen. In der ersten Runde wurde das Fenster so gelegt das ca. 0,1% aller Zellen sortiert werden sollten [Abb. 4.17]. Anschließend erfolgte die Sortierung von  $3 \times 10^8$  Zellen. Die sortierten Zellen wurden in 1 mL SDCAA gesammelt und nach der Prozedur in 5mL SDCAA überführt und zwei Tage bei 30°C wieder anwachsen gelassen. Danach wurden die Zellen einmal in 5 mL SDCAA Medium passagiert und anschließend aus einem Teil Glycerolstocks in low-SDCAA Medium angefertigt und mit dem anderen Teil 5 mL SGCAA auf eine  $OD_{600}$  1 eingestellt und erneut die Induktion für die zweite Sortierrunde gestartet.

In der zweiten Sortierrunde wurden  $10^7$  Zellen für die Markierung mit Matriptase eingesetzt, dabei wurde die Konzentration auf 100 nM verringert. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmarkierung mit mit SAPE, anti-myc Antikörper und dem dazugehörigen sekundären FITC markierten Antikörper (Methode 3.6.1). Es folgte die Messung der Kontrollen und eine Messung einer kleinen Probe zur Feststellung des Sortierfensters und der gesamten Bibliothek (Methode 3.6.2). Die sortierten Zellen wurden in 1 mL SDCAA Medium gesammelt und in 5 mL SDCAA Medium zwei Tage anwachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen in SDCAA passagiert und danach für Glycerolstocks und die nächste Induktion aufgeteilt.

Die Durchführung der dritten Runde und vierten Runde erfolgten analog zur zweiten Runde. Es wurden lediglich die Konzentrationen der Protease über 50 nM auf 10 nM verringert [Tab. 4.7]. Nach der vierten Runde wurden keine weiteren Selektionen mehr durchgeführt und die einzelnen Runden einer genaueren Analyse unterzogen.

Tabelle 4.7 Zusammenfassung der Proteasekonzentration, eingesetzten und selektierten Zellen für die einzelnen Selektionsrunden der MCoTI Bibliothek II

Selektionsrunde	Matriptasekonzentration	Eingesetzte Zellen	Sortierte Zellen
<b>Runde 1</b>	500 nM	$3 \times 10^8$	$1,3 \times 10^5$ (0,1%)
<b>Runde 2</b>	100 nM	$6 \times 10^6$	$3,0 \times 10^4$ (0,5%)
<b>Runde 3</b>	50 nM	$1 \times 10^7$	$1,5 \times 10^4$ (0,2%)
<b>Runde 4</b>	10 nM	$5 \times 10^6$	$5,0 \times 10^4$ (1,0%)

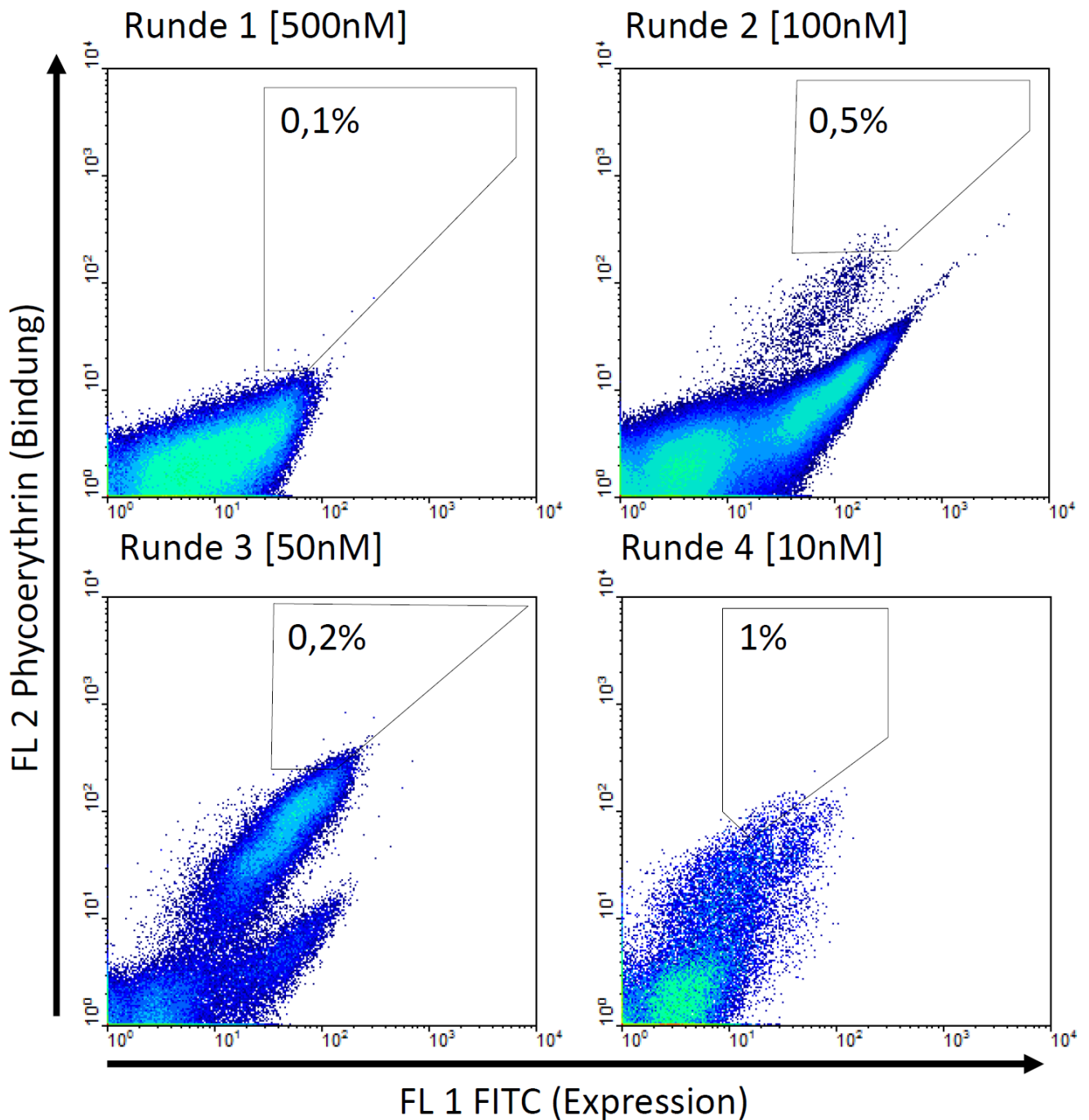


Abbildung 4.10 Zweidimensionale Darstellung der einzelnen Selektionsrunden für die MCoTI Bibliothek I. Die Y-Achse zeigt logarithmisch die Fluoreszenz von Phycoerythrin an, welches an die Protease gekoppelt ist und damit ein Nachweis für die Bindung ist. Die X-Achse zeigt logarithmisch die Fluoreszenz von FITC an, welches über zwei Antikörper an das Myc-Epitop gebunden ist und damit ein Nachweis für die Expression ist. Oben links dargestellt die mit 500nM MT-SP1 markierten Zellen vor der ersten Runde, mit dem Sortierfenster für 0,1% der Population. Oben rechts dargestellt die mit 100nM MT-SP1 markierten Zellen vor der zweiten Runde, mit dem Sortierfenster für 0,5% der Population. Unten links dargestellt die mit 50nM MT-SP1 markierten Zellen vor der dritten Runde, mit dem Sortierfenster für 0,2% der Population. Unten rechts dargestellt die mit 10nM MT-SP1 markierten Zellen vor der vierten Runde, mit dem Sortierfenster für 1% der Population.

#### 4.10.4. Analyse selektierter MCoTI Varianten

Nachdem die Durchmusterungen mittels FACS beendet waren, wurden aus den beiden Bibliotheken einzelne Varianten im FACS vermessen, deren Plasmide isoliert und Sequenzen bestimmt um herauszufinden, ob sich bestimmte Klone angereichert haben. Dazu wurden zwei unterschiedliche Vorgehensweisen getestet um zu erfahren mit, welcher Methode sich besser hoch affine Inhibitoren und deren Sequenzen identifizieren lassen. Bei der Ersten wird zunächst die FACS Analyse für die einzelnen Klone durchgeführt und aus den besten werden die Plasmide isoliert und die Sequenzen bestimmt. Bei der zweiten Vorgehensweise werden aus den einzelnen Runden die Plasmide isoliert und sequenziert, anschließend erfolgt die Bestimmung im FACS für unterschiedliche Klone.

Für die erste Vorgehensweise wurden dazu Verdünnungsplattierungen der einzelnen FACS Runden auf SDCAA Platten ausgestrichen. Anschließend wurde mehrere Kolonien jeder Selektion in jeweils 1 mL SDCAA Medium bei 30°C inokuliert. Diese wurden dann in 1 mL SGCAA auf OD<sub>600</sub> 1 eingestellt und die Induktion 2 Tage bei 25°C durchgeführt. Im nächsten Schritt folgten die Markierung von  $1 \times 10^7$  Zellen mit biotinylierter Matriptase (250 nM) und mit den entsprechenden Fluorophoren (Methode 3.6.1). Die Einzelklone wurden dann im FACS gemessen (Methode 3.6.2) und analysiert. Dazu wurde die mittlere Fluoreszenz (*mean fluorescence unit*) der Miniprotein präsentierenden Population bestimmt [Abb. 4.18]. Um die Messungen an verschiedenen Tagen vergleichen zu können wurde die Fluoreszenz der Positivkontrolle gleich eins gesetzt und die einzelnen Varianten damit verglichen (relative MFU). Es war zu erkennen, dass mit jeder Runde die Anzahl von Klonen zunimmt die eine höhere Fluoreszenz als Matriptase aufweisen. Aus den besten Hefeklonen wurde anschließend das Plasmid isoliert (Methode 3.2.6) und mit *E.coli* retransformiert (Methode 3.1.5). Darauf erfolgte wiederum die Isolierung des Plasmides (Methode 3.2.5.1) und anschließend die Bestimmung der Sequenz mit dem Oligonucleotid pCT\_seq\_lo [Tab. 4.8].

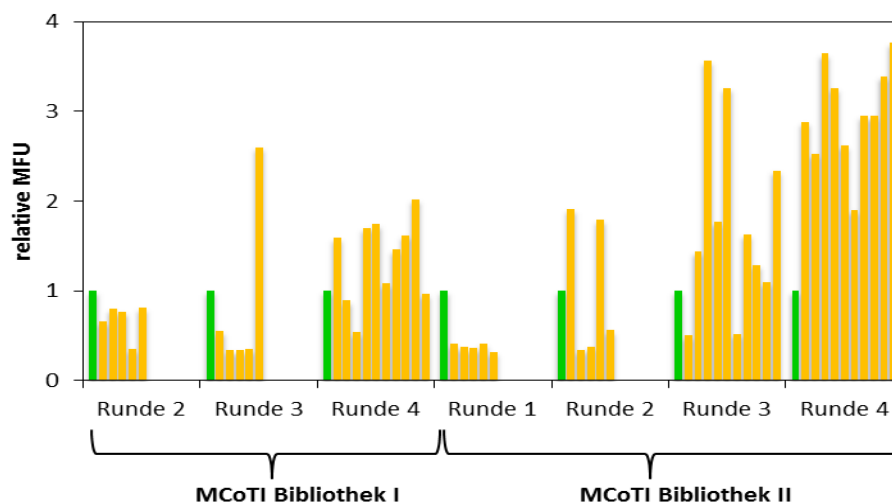


Abbildung 4.11 Auftragung der Einzelklone aus verschiedenen Runden der beiden selektierten MCoTI Bibliotheken I und II. Es wurde die mittlere Fluoreszenz der Population, der Miniprotein präsentierenden Zellen bestimmt. Die Werte für den Matriptase / Wildtyp MCoTI-II (grün) wurden gleich eins gesetzt und die Einzelklone dazu ins Verhältnis.

Für die zweite Vorgehensweise wurden die Pools der einzelnen Runden genommen und die Plasmide daraus isoliert (Methode 3.2.6). Die Pools wurden mit *E.coli* transformiert (Methode 3.1.5) und anschließend die Plasmide aus einzelnen Klonen isoliert (Methode 3.2.5.1). Diese wurden mit pCT seq lo sequenziert [Tab 4.8] und zurück in *S.cerevisae* transformiert (Methode 3.1.6), in 1 mL SDCAA Medium bei 30°C angezogen und in 1 mL SGCAA Medium für zwei Tage bei 25°C induziert. Abschließend erfolgte die Markierung mit Matriptase (250 nM) und den Fluorophoren (Methode 3.6.1) und die Analyse im FACS (Methode 3.6.2). Es wurde die Fluoreszenz in Bezug auf die Positivkontrolle Matriptase / oMCoTI-II bestimmt [Abb. 4.19].

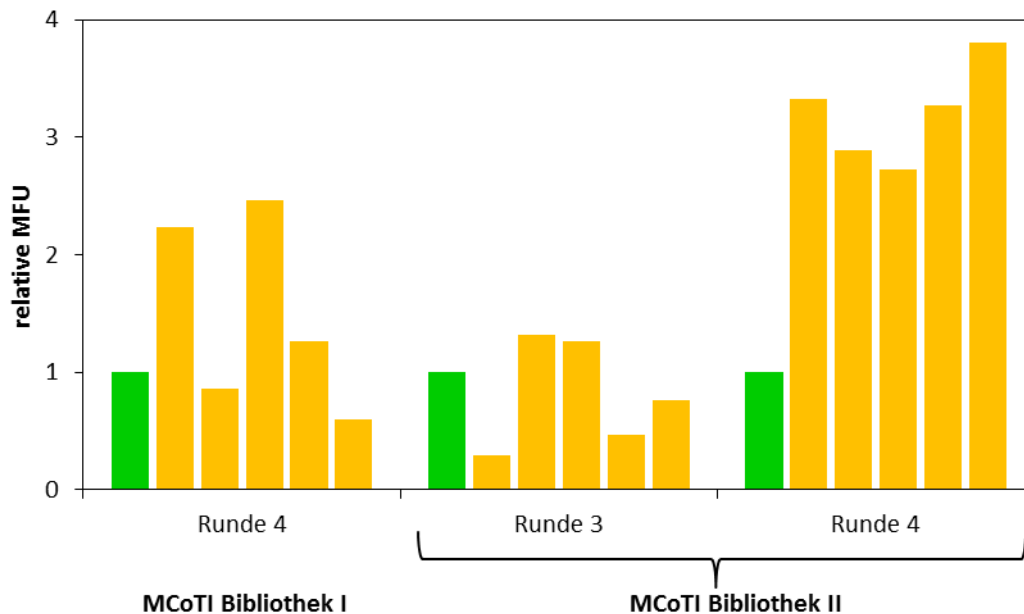


Abbildung 4.12 Auftragung der sequenzierten Einzelklone aus verschiedenen Runden der beiden selektierten MCoTI Bibliotheken I und II nach der zweiten Vorgehensweise. Es wurde die mittlere Fluoreszenz der Population, der Miniprotein präsentierenden Zellen bestimmt. Die Werte für den Matriptase / Wildtyp MCoTI-II (grün) wurden gleich eins gesetzt und die Einzelklone dazu ins Verhältnis.

Die einzelnen Sequenzen aus beiden Bibliotheken wurden zusammen mit ihren zugehörigen Fluoreszenzwerten abgeglichen und analysiert. Daraufhin sollte ein Peptid mit der durch Sequenzierung bestimmten Sequenz aus der Bibliothek I und zwei aus der Bibliothek II synthetisiert werden. Der Einfachheit halber wurden diese als MC Clone1 bis 4 benannt. Aus der MCoTI Bibliothek I und II wurden die Miniproteinvariante mit den höchsten Werten für die Fluoreszenz gewählt (MC Clone1 und MC Clone4) [Abb. 4.20]. Ebenso wurde aus der Bibliothek II die am häufigsten vorkommende Sequenz (MC Clone3) ausgewählt. Weiterhin sollte eine vierte Miniproteinvariante (MC Clone2) synthetisiert werden die von Dipl. Biol. Bernhard Glotzbach in einer erneuten Selektion gegen Matriptase isoliert wurde.

Tabelle 4.8 Auflistung der Aminosäuresequenzen für alle sequenzierten Einzelklone aus beiden selektierten Bibliotheken.

<b>Einzelklone/Runde</b>	<b>Sequenz</b>
<b>Bibliothek I</b>	
<b>Erste Vorgehensweise</b>	
EK1 R4	MASKQCPKLAKRCHEDSDCPGACICRNGNGYCG
EK4 R4	MASKQCPKLAKRCHEDSDCPGACICRNGNGYCG
EK5 R4	MASKQCPKLAKRCHEDSDCPGACICRNGNGYCG
EK8 R4	MASKQCPKLAKRCHEDSDCPGACICRNGNGYCG
<b>Zweite Vorgehensweise</b>	
EK1 R4	MASLCPKMMRKCRRDSDCPGACICRNGNGYCG
EK2 R4	MASPKCGKIMRICRRDSDCPGACICRNGNGYCG
EK3 R4	MASLCPKMMRKCRRDSDCPGACICRNGNGYCG
EK4 R4	MASPKCGKIMRICRRDSDCPGACICRNGNGYCG
EK5 R4	MASLCPKMMRKCRRDSDCPGACICRNGNGYCG
<b>Bibliothek II</b>	
<b>Erste Vorgehensweise</b>	
EK3 R3	MAKGVC PKVLRKCRKDSDCPGACICRANGYCG
EK5 R3	MAWGVC PKVLRNCRRDSDCPGACICLGNGYCG
EK3 R4	MAKGVC PKVLRKCRKDSDCPGACICRANGYCG
EK4 R4	MAKGVC PKVLRKCRKDSDCPGACICRANGYCG
EK7 R4	MAKGVC PKVLRKCRKDSDCPGACICRANGYCG
EK10R4	MAKGVC PKVLRKCRKDSDCPGACICRANGYCG
<b>Zweite Vorgehensweise</b>	
EK1 R3	MAWGECPRMRRQCRRRSDCPGACICRGNGYCG
EK2 R3	MAWGVC PKVLRNCRRDSDCPGACICLGNGYCG
EK3 R3	MAKGVC PKSLRKCREDSDCPGACICRGNGYCG
EK4 R3	MASGVC PKLLRQCRWSDCPGACICRGNGYCG
EK5 R3	MASGVC PKLLRRCVRDSDCPGACICRGNGYCG
EK1 R4	MAKGVC PKVLRKCRKDSDCPGACICRANGYCG
EK2 R4	MAIGVC PKSLRRCRTDSDCPGACICRGNGYCG
EK3 R4	MANGRC PKIMRICRRDSDCPGACICRGNGYCG
EK4 R4	MAKGVC PKVLRKCRKDSDCPGACICRANGYCG
EK5 R4	MAWGVC PKVLRNCRRDSDCPGACICLGNGYCG

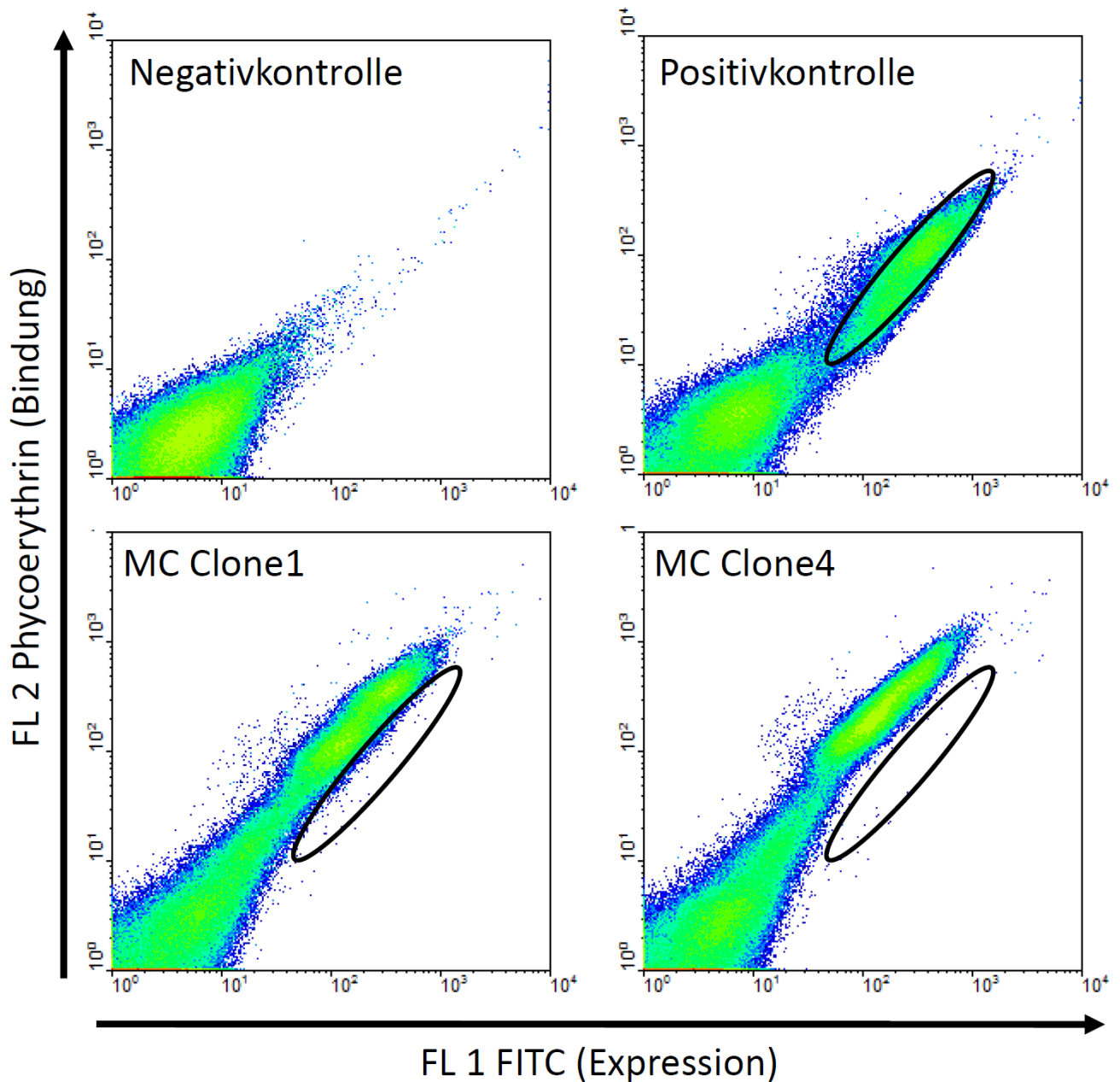


Abbildung 4.20 Zweidimensionale Darstellung der jeweils besten Varianten aus den Durchmusterungen der beiden Bibliotheken. Die Y-Achse zeigt logarithmisch die Fluoreszenz von Phycoerythrin an, welches an die Protease gekoppelt ist und damit ein Nachweis für die Bindung ist. Die X-Achse zeigt logarithmisch die Fluoreszenz von FITC an, welches über zwei Antikörper an das Myc-Epitop gebunden ist und damit ein Nachweis für die Expression ist. Die Markierung der Zellen erfolgte mit einer Matriptasekonzentration von 250 nM. Oben links dargestellt ist die Negativkontrolle. Oben rechts dargestellt ist die Positivkontrolle mit oMCoTI-II. Unten links dargestellt ist der aus Bibliothek I selektierte MC Clone1. Unten rechts dargestellt ist der aus Bibliothek II selektierte MC Clone4. Zum besseren Vergleich der beiden hochaffinen Matriptaseinhibitoren ist die Population der Positivkontrolle als schwarze Ellipse dargestellt.

#### 4.11. Chemische Synthese gefundener MCoTI-II Varianten

Die Synthese aller vier ausgewählten Miniprotein Varianten wurde mit automatischer Peptidfestphasensynthese am *Liberty<sup>TM</sup>* Synthesizer durchgeführt (Methode 3.7.2). Dabei wurde eine gemeinsame Synthesestrategie für jeweils zwei Proteine gewählt und das Harz an der entsprechenden Stelle aufgeteilt.

##### 4.11.1. MC Clone1



$C_{130}H_{215}N_{45}O_{39}S_8$  [3289 g/mol]

Für die automatische Synthese wurde 1 g TGR-Harz eingesetzt und bis zur 20sten Aminosäure synthetisiert. Anschließend wurde das Harz zu gleichen Teilen für MC Clone1 und MC Clone2 verwendet und die Synthese vervollständigt. Nach der Abspaltung vom Harz und ebenso der Rückfaltung erfolgte eine Analyse mittels RP-HPLC und ESI-MS, anschließend erfolgte die präparative HPLC. Es wurden 50 mg lineares Peptid erhalten. Die Ausbildung der Disulfidbrücken wurde in Rückfaltungspuffer II mit 5 mg durchgeführt. Es wurden 3 mg Ausbeute erhalten.

Analytische Daten:

HPLC:  $R_t = 10,6$  min (10→80 in 20 min)

MS ESI m/z: 1645,5[M+2H]<sup>2+</sup> 1097,3[M+3H]<sup>3+</sup>

##### 4.11.2. MC Clone2



$C_{129}H_{213}N_{49}O_{39}S_6$  [3266,8 g/mol]

Für die automatische Synthese wurde 1 g TGR-Harz eingesetzt und bis zur 20sten Aminosäure synthetisiert. Anschließend wurde das Harz zu gleichen Teilen für MC Clone1 und MC Clone2 verwendet und die Synthese vervollständigt. Nach der Abspaltung vom Harz und ebenso der Rückfaltung erfolgte eine Analyse mittels RP-HPLC und ESI-MS, anschließend erfolgte die präparative HPLC. Es wurden 20 mg lineares Peptid erhalten. Die Ausbildung der Disulfidbrücken wurde in Rückfaltungspuffer II mit 5 mg durchgeführt. Es wurden 2 mg Ausbeute erhalten.

Analytische Daten:

HPLC:  $R_t = 9,3$  min (10→80 in 20 min)

MS ESI m/z: 1634,4[M+2H]<sup>2+</sup> 1089,9[M+3H]<sup>3+</sup>



#### 4.11.3. MC Clone3



$C_{130}H_{216}N_{44}O_{38}S_6$  [3195,8 g/mol]

Für die automatische Synthese wurde 1 g TGR-Harz eingesetzt und bis zur 5ten Aminosäure synthetisiert. Anschließend wurde das Harz zu gleichen Teilen für MC Clone3 und MC Clone4 verwendet und die Synthese vervollständigt. Nach der Abspaltung vom Harz und ebenso der Rückfaltung erfolgte eine Analyse mittels RP-HPLC und ESI-MS, anschließend erfolgte die präparative HPLC. Es wurden 40 mg lineares Peptid erhalten. Die Ausbildung der Disulfidbrücken wurde in Rückfaltungspuffer II mit 5 mg durchgeführt. Es wurden 3 mg Ausbeute erhalten.

HPLC:  $R_t = 9,1$  min (10→80 in 20 min)

MS ESI m/z: 1598,9[M+2H]<sup>2+</sup> 1066,3[M+3H]<sup>3+</sup>

#### 4.11.4. MC Clone4



$C_{132}H_{205}N_{43}O_{39}S_6$  [3210,8 g/mol]

Für die automatische Synthese wurde 1 g TGR-Harz eingesetzt und bis zur 5ten Aminosäure synthetisiert. Anschließend wurde das Harz zu gleichen Teilen für MC Clone3 und MC Clone4 verwendet und die Synthese vervollständigt. Nach der Abspaltung vom Harz und ebenso der Rückfaltung erfolgte eine Analyse mittels RP-HPLC und ESI-MS, anschließend erfolgte die präparative HPLC. Es wurden 20 mg lineares Peptid erhalten. Die Ausbildung der Disulfidbrücken wurde in Rückfaltungspuffer II mit 5 mg durchgeführt. Es wurden 2 mg Ausbeute erhalten.

HPLC:  $R_t = 11,9$  min (10→80 in 20 min)

MS ESI m/z: 1606,4[M+2H]<sup>2+</sup> 1071,3[M+3H]<sup>3+</sup>

#### 4.12. Bestimmung apparenter $K_i$ 's gefundener MCoTI-II Varianten gegenüber MT-SP1

Die Bestimmung der apparenten Inhibitionskonstante der durch *yeast surface display* gefundenen und anschließend synthetisierten Varianten erfolgte analog wie schon bei den zuvor durchgeführten Messungen in dieser Arbeit. Dazu wurde zunächst Trypsin titriert (Methode 3.5.1.1) und damit die aktive Inhibitorkonzentration bestimmt (Methode 3.5.4). Die Varianten wurden dann auf ihre Inhibition gegenüber Trypsin (Methode 3.5.2) und Matriptase (Methode 3.5.3) untersucht [Tab. 4.9]. Die Bestimmung von Matriptase erfolgte diesmal mit dem Chromophor Boc-Gln-Ala-Arg-pNA. Für Vergleiche mit dem Ausgangsprotein oMCoTI-II wurden ebenfalls die Werte für die zweite synthetisierte Variante aus Abschnitt 4.6.1 bestimmt. Alle Messungen wurden zweimal durchgeführt und die Mittelwerte bestimmt. Für alle Miniproteine wurde zunächst ein Bereich von 1nM bis 1 $\mu$ M für die Messung gegen Matriptase gewählt. Für die beiden Varianten MC Clone1 und MC Clone4 wurde nach den erhaltenen Werten der Bereich auf 1nM bis 200nM mit der gleichen Anzahl an Messpunkten verkleinert um genauere Werte für die  $K_{iapp}$ 's zu erhalten.

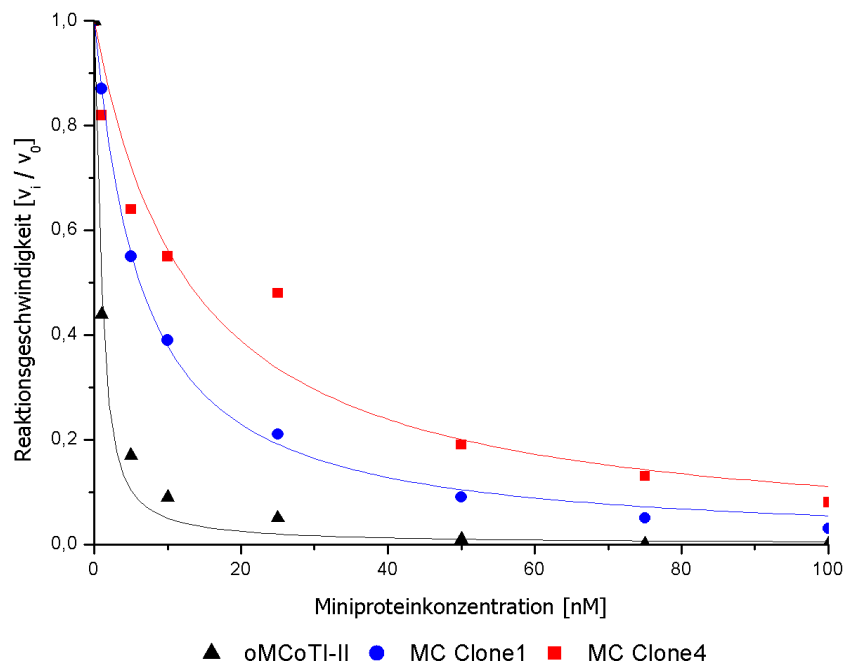
Tabelle 4.9 Zusammenfassung der  $K_{iapp}$ 's gegen Trypsin und Matriptase für isolierte Varianten aus dem *yeast surface display*.

Miniprotein	$K_{iapp}$ Trypsin [nM]	$K_{iapp}$ Matriptase [nM]
oMCoTI-II (Variante II)	1,1	159
MC Clone1	11,9	8,7
MC Clone2	16,4	69
MC Clone3	16,5	111
MC Clone4	16,1	3,7

Die apparenten Inhibitionskonstanten gegenüber Trypsin sind um mehr als ein zehnfaches höher als die offenkettige Variante des nativen MCoTI-II. Dabei ist ein Unterschied zwischen MC Clone1 und den anderen 3 Varianten zu erkennen, da sich bei diesem die Aminosäuren in der Inhibitorschleife deutlich von den anderen unterscheiden. Alle aus dem *yeast surface display* isolierten Varianten haben eine höhere Affinität gegenüber Matriptase I aus, als oMCoTI-II. Dabei weisen die beiden besten Klone MC Clone1 und MC Clone4 unterschiedliche Sequenzen in der Inhibitorschleife aus. Auch sind die apparenten Inhibitionskonstanten über einen weiten Bereich gestreut.

Die jeweiligen Kinetikmessungen für oMCoTI-II und die beiden besten Klone MC Clone1 und MC Clone4 sind graphisch dargestellt [Abb. 4.21]. Aufgetragen sind die relativen Reaktionsgeschwindigkeiten in Bezug auf die nicht inhibierte Reaktion gegen die eingesetzte Menge an Miniprotein. Ebenfalls mit aufgetragen sind die gefitteten Kurven der Morrisongleichung. Deutlich zu erkennen ist die schlechtere Inhibition gegen Trypsin in Teil A für die beiden isolierten Varianten. Die Inhibition gegenüber Matriptase in Teil B zeigt deutlich eine bessere Inhibition durch die beiden isolierten Varianten.

A



B

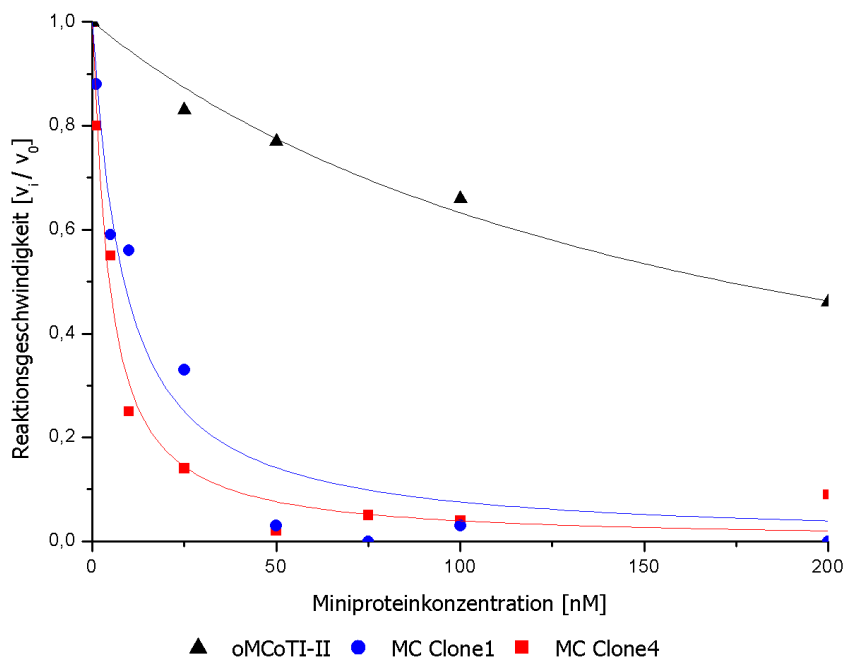


Abbildung 4.21 A: Inhibitionsmessungen gegen Trypsin für oMCoTI-II, MC Clone1 und 4 mit jeweiligem Fit nach Morrison.  
 B: Inhibitionsmessungen gegen Matrilysin für oMCoTI-II, MC Clone1 und 4 mit jeweiligem Fit nach Morrison.

#### 4.13. Bestimmung der Proteasespezifität

Nachdem die apparenten Inhibitionskonstanten gegen Matriptase ermittelt worden sind, wurde noch untersucht ob die aus dem *yeast surface display* isolierten Varianten spezifisch für Matriptase sind oder ebenso andere Proteasen inhibieren [Tab. 4.10]. Als exemplarische Proteasen wurden hierzu Thrombin und Faktor Xa aus der Blutgerinnungskaskade gewählt. Ebenso wurde die Inhibition gegen Urokinase, einer genauso wie MT-SP1 in der extrazellulären Matrix vorkommenden Protease gewählt. Aus der Literatur ist bekannt das MCoTI-II sehr spezifisch gegen Trypsin ist und fast keine Inhibition ( $>1\mu\text{M}$ ) gegen diese anderen häufig vorkommende Proteasen zeigt.<sup>[140]</sup>

Die Durchführung der Messungen erfolgte mit den gleichen Reaktionsbedingungen wie für Trypsin (Methode 3.5.2). Anstelle von Trypsin wurden allerdings Endkonzentrationen für Thrombin von 2,5 nM und für Urokinase und Faktor Xa von 20 nM eingesetzt. Die Substratkonzentration wurde aufgrund der geringen Spezifität von Urokinase, für diese Protease auf 500  $\mu\text{M}$  erhöht. Es wurden Messungen mit jeweils 1  $\mu\text{M}$  Miniproteinkonzentration für alle drei Proteasen durchgeführt und die Messungen zweimal durchgeführt. Als Kontrollen wurden eine nicht inhibierte Reaktion und eine mit Überschuss an PMSF inhibierte Reaktion aufgetragen.

Dabei stellte sich heraus, dass die Anfangssteigungen aller Miniproteine im Bereich der nicht inhibierten Reaktion lagen und keinerlei Inhibition bei dieser Konzentration zeigten. Es wurde die Schlussfolgerung daraus gezogen, dass alle apparenten Inhibitionskonstanten weit über diesen Werten liegen und auf weitere Untersuchungen zur genauen Bestimmung der  $K_{iapp}$  wurde verzichtet.

Tabelle 4.10 Bestimmung der apparenten Inhibitionskonstanten der isolierten MCoTI Varianten für Thrombin, FaktorXa und Urokinase. Alle Inhibitoren zeigten bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  keine Inhibition gegenüber den jeweiligen Proteasen.

Miniprotein	$K_{iapp}$ Thrombin [nM]	$K_{iapp}$ Faktor Xa [nM]	$K_{iapp}$ Urokinase [nM]
oMCoTI-II (Variante II)	> 1000	> 1000	> 1000
MC Clone1	> 1000	> 1000	> 1000
MC Clone2	> 1000	> 1000	> 1000
MC Clone3	> 1000	> 1000	> 1000
MC Clone4	> 1000	> 1000	> 1000

#### 4.14. Diskussion III

Im dritten Abschnitt dieser Arbeit sollten zunächst zwei kombinatorische Bibliotheken basierend auf dem MCoTI-II *scaffold* in *S. cerevisiae* hergestellt werden und anschließend mittels *yeast surface display* neue hochaffine Inhibitoren selektiert werden.

Zunächst wurden die beiden Bibliotheken durch Trimere erzeugt. Dies ermöglichte das exakte Einfügen der gewünschten Aminosäuren und damit eine an die zu selektierenden Antigene angepasste Bibliothek. Besonderes Augenmerk lag dabei darauf, dass keine weiteren Cysteine eingefügt werden, da sich sonst das Cystinknoten Motiv nicht korrekt ausbilden kann. Ebenfalls wichtig ist der Erhalt des Prolin im Inhibitorloop, da es eine essentielle Rolle in der Faltung spielt.

Für die Transformation von *S. cerevisiae* wurden relativ geringe Transformantenzahlen ( $5 \times 10^5 / \mu\text{g}$  Vektor) für die Bibliothek I erhalten und deshalb verschiedene Bedingungen getestet die Änderungen im Vektor:Insert Verhältnis, der Transformationseinstellungen, sowie der DNA Aufreinigungsmethoden beinhalteten um eine bessere Transformationseffizienz zu erhalten. Diese führten jedoch zu keinem positiven Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Bei der MCoTI Bibliothek II wurde die Transformation daraufhin mit einer neue Methode durchgeführt die eine zehnfach erhöhte Transformantenzahl pro  $\mu\text{g}$  Vektor ermöglichte.<sup>[211]</sup> Damit konnten die Zeit und Kosten für die Erstellung der Bibliotheken erheblich reduziert werden.

Bevor mit der Selektion der Bibliotheken begonnen werden konnte, wurden mit dem Trypsin und Matriptase getestet, ob die Bindung für unterschiedlich starke Inhibition durch MCoTI-II unterschiedliche Signale im FACS ergibt [Abb. 4.14]. Systembedingt präsentierte immer nur eine geringe Zahl der Zellen das Miniprotein, da ein Teil der Tochterzellen das Plasmid während der Induktion verlieren kann. Anschließend wurden die optimalen Induktionsbedingungen evaluiert, dabei stellte sich eine Induktion von 25°C über zwei Tage als die beste Wahl heraus, da bei niedrigeren Temperaturen zwar die Geschwindigkeit der Expression abnimmt, aber gleichzeitig die Anzahl präsentierten Miniproteine durch eine korrekte Faltung zunimmt.

Die erste Selektion sollte mit der einfach durchzuführenden Methode über magnetischen Beads stattfinden um die Diversität der Bibliothek zu verringern. Allerdings stellte sich nach der Selektion heraus, dass keine Miniprotein präsentierenden Zellen angereichert werden konnten [Abb. 4.15]. Weitere Versuche mit MACS und eine genaue Recherche warum das Experiment nicht funktionierte wurden nicht durchgeführt und beide Bibliotheken von Anfang an direkt im FACS durchmustert.

Die Selektion im FACS wurde mit zehnfachem Überschuss an Zellen durchgeführt um die Diversität der Bibliotheken zu erhalten. Zunächst wurde die Durchmusterung mit einer hohen Konzentration an Protease (1  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt um eine Vielzahl an Bindern zu isolieren. Die nächste Runde wurde mit der gleichen Konzentration an Matriptase durchgeführt, um zu untersuchen ob sich eine bindende Population angereichert hat. Aus dieser Population wurden die Zellen mit der höchsten Fluoreszenz sortiert und in den darauffolgenden Runden die Konzentration an Protease verringert, um Varianten mit höherer Affinität zu identifizieren. Es ist eine deutliche Matriptase bindende Population bereits nach der ersten Runde zu erkennen [Abb. 4.16]. Im Vergleich der ersten beiden Selektionsrunden mit der dritten und vierten Runde war nur eine geringe Expression zu erkennen, was aber auf einen schwachen Laser zurückzuführen ist, der zwischen den einzelnen Durchmusterungen gegen einen neuen Laser ausgetauscht wurde.

Die Durchmusterung mit der MCoTI Bibliothek II erfolgte in der ersten Runde mit einer geringeren Konzentration an Matriptase (500 nM), da hier bereits durch das Design eine höhere Wahrscheinlichkeit gegeben war, Binder gegen trypsinähnliche Proteasen zu selektieren. In der zweiten Selektionsrunde wurde aus den Erfahrungen der ersten Bibliothek direkt die Konzentration an Matriptase (100 nM) verringert. Die Miniproteine präsentierenden Zellen spalteten sich in zwei Populationen auf, wobei aus derjenigen mit der höheren Fluoreszenz im Phycoerythrin Kanal selektiert wurde. In der dritten Runde wurde die Konzentration (50 nM) weiter gesenkt und es zeigte sich, dass die Mehrzahl der Zellen die höhere Population stellte. In der vierten Runde wurde wieder eine niedrigere Konzentration (10 nM) gewählt. Dabei ist nur eine Population zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass bereits eine große Anreicherung einiger weniger Miniproteine erfolgte. Die geringe Fluoreszenz für die Expression ist dabei auf eine schlechte Markierung mit den dafür nötigen Antikörper zurückzuführen [Abb. 4.17].

Nachdem die Bibliotheken gegen Matriptase durchmustert worden waren, wurde die Fluoreszenz einzelner Klone aus verschiedenen Runden bestimmt und miteinander verglichen [Abb. 4.18]. Dabei zeigte sich, dass für die erste Bibliothek ca. 65% und für die zweite Bibliothek 100% aller untersuchten Klone nach der vierten Runde eine höhere Fluoreszenz aufwiesen. Anschließend wurden die Klone mit der besten Fluoreszenz sequenziert und es ergab sich folgende Aminosäurenverteilung für die aus *S. cerevisiae* isolierten Plasmide für die jeweiligen Bibliotheken [Abb. 4.22].

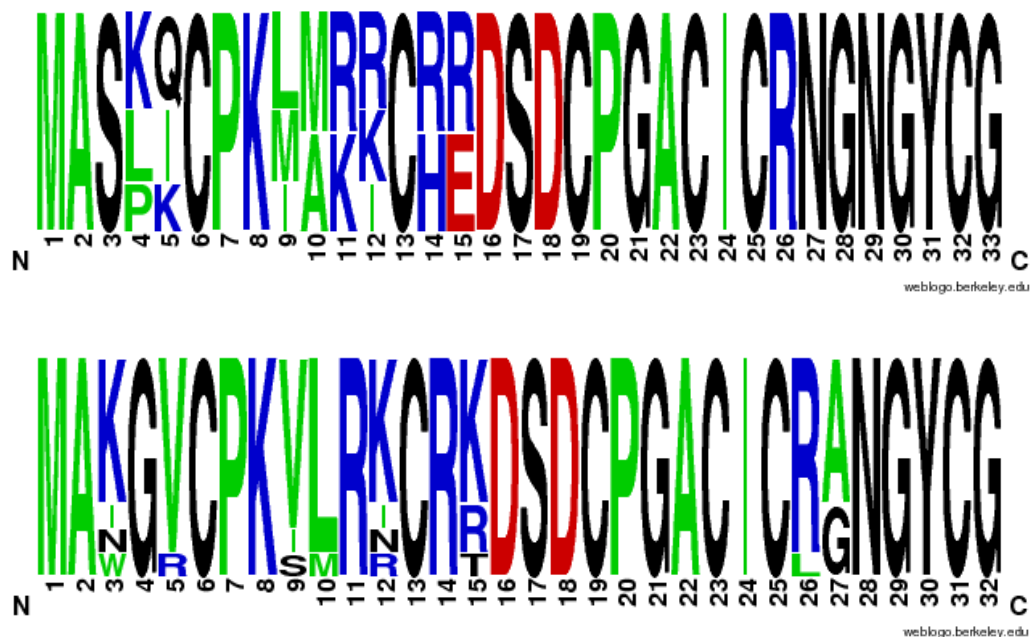


Abbildung 4.13 Aminosäurenverteilung nach der vierten Selektionsrunde im *yeast surface display* für die beiden MCoTI Bibliotheken. Oben dargestellt Bibliothek I. Unten dargestellt Bibliothek II. Es ist in der Inhibitorschleife ein Motiv KXXR zu erkennen. X steht dabei für aliphatische Aminosäuren. Die Höhe der Buchstaben stellt graphisch die Häufigkeit dar, mit der die jeweiligen Aminosäuren an den jeweiligen Positionen angetroffen werden. Erstellt mit <sup>[242]</sup>

Es ist zu erkennen, dass sich in der Inhibitorschleife ein charakteristisches Motiv gebildet hat, welches sich in beiden unabhängig voneinander durchgeführten Selektionen wieder findet. An Position 8 befindet sich immer ein Lysin, darauf folgen an den Positionen 9 und 10 jeweils zwei aliphatische Aminosäuren und an Position 11 ein Arginin oder in Ausnahmen ein Lysin. In Bibliothek I ergaben sich für Einzelklone mit der höchsten Fluoreszenz als bevorzugte aliphatische Aminosäuren zwei Methionine und in Bibliothek II ein Valin und Leucin.

Weiterhin wurden in Bibliothek II an den Positionen 26 und 27 jeweils ein Leucin oder ein Alanin gefunden, wobei der Einzelklon mit dem Alanin der am häufigsten vorkommende war und der mit Leucin der mit der höchsten Fluoreszenz. Die drei beschriebenen Einzelklone wurden zusammen mit einer von Dipl. Biol. Bernhard Glotzbach gefundenen Sequenz, die ebenfalls ein Lys-Val-Leu-Arg Motiv besaß synthetisiert und mit einem von Dipl. Ing. Michael Reinwarth entwickelten Puffer rückgefaltet.

Die enzymkinetischen Untersuchungen ergaben für die vier unterschiedlichen Miniproteinvarianten gegenüber Trypsin zehn bis fünfzehnfach schlechtere apparente Inhibitionskonstanten als das Wildtypprotein. Wobei MC Clone1 mit den beiden Methioninen eine bessere Inhibition zeigte als die anderen drei Proteine, die aber alle nahezu die gleiche  $K_{iapp}$  aufwiesen. Gegenüber Matriptase zeigten diese drei Miniproteine aber komplett unterschiedliche apparente Inhibitionskonstanten.

So zeigte MC Clone4 mit einer  $K_{iapp}$  von 3,7 nM eine über 40fach bessere Inhibition als das Wildtypprotein und bestätigte damit die Fluoreszenzmessungen. Die anderen beiden zeigten aber lediglich nur geringfügig bessere Inhibition als oMCoTI-II. Im Gegensatz dazu zeigte MC Clone1 mit seinen anderen Aminosäuren ebenfalls eine  $K_{iapp}$  von 8,7 nM. Ein weiteres Merkmal für eine gute Inhibition könnten die hydrophoben Aminosäuren von MC Clone1 (Ser-Leu-Ile) und MC Clone4 (Trp-Gly-Val) in den Positionen 1 – 3 durch eine Interaktion mit Phe<sup>97</sup> der Protease darstellen. Um die wirkliche Inhibitionskonstante zu berechnen [Abb. 4.23] ist es nötig, den  $K_M$  Wert für das eingesetzte Substrat Boc-Gln-Ala-Arg-pNA zu kennen. Diese Arbeit wurde von Dipl. Biol. Niklas Weber durchgeführt und die Michael-Menten Konstante zu 240  $\mu$ M bestimmt. Damit ergeben sich für die beiden selektierten Miniproteine tatsächliche Inhibitionskonstanten von weniger als 3 nM.

$$K_{iapp} = K_i \left( 1 + \frac{[S]}{[K_M]} \right)$$

Miniprotein	$K_i$ [nM]
oMCoTI-II	52
MC Clone1	2,8
MC Clone4	1,2

Abbildung 4.14 Links dargestellt die Formel zur Berechnung der  $K_i$  aus der  $K_{iapp}$ . Rechts dargestellt die tatsächlichen Inhibitionskonstanten für oMCoTI-II und die beiden besten aus dem *yeast surface display* selektierten Varianten.

Abschließend wurden die vier synthetisierten Miniproteine noch auf ihre Selektivität gegenüber anderen Proteasen untersucht und es konnte gezeigt werden, dass die Varianten spezifisch für Matriptase sind [Tab. 4.10]. Vergleicht man die hergestellten Miniproteine mit aus der Literatur bekannten Inhibitoren gegen Matriptase z.B. SFTI<sup>[109]</sup> oder mit *Phage Display* gefundenen Eglin C Varianten<sup>[107]</sup>, so ist zu erkennen, dass die gefundenen Miniprotein Varianten ebenfalls in diesen Bereichen liegen. Lediglich die Inhibitionskonstanten von niedermolekularen Substanzen<sup>[243]</sup> liegen noch darunter. Aber im Gegensatz zu diesen Peptidomimetika weisen die Miniproteine eine höhere Selektivität gegenüber anderen Proteasen wie z.B. Faktor Xa oder Urokinase auf.

Die erhaltenen Resultate zeigen, dass das *yeast surface display* eine gute Methode der gerichteten Evolution zur Selektion neuer Inhibitoren gegen therapeutisch interessante Proteasen darstellt. Durch veränderte Bedingungen, wie z.B. längere Inkubationszeiten, hinzufügen von nicht markierten Inhibitoren oder weitere Verringerung der Proteasekonzentration könnten noch besser auf hochaffine Inhibitoren selektiert werden.

Von den beiden in dieser Arbeit erzeugten MCoTI Bibliotheken, stellte sich die zweite Bibliothek mit der für Trypsin ähnliche Serinproteasen spezifischen Randomisierung als die bessere heraus. Aus dieser Bibliothek konnten nach mehreren Selektionsrunden mehr Varianten mit einer höheren Fluoreszenz gegen Matriptase im FACS identifiziert werden, als aus der ersten Bibliothek in der der komplette Inhibitorloop randomisiert war. Ebenfalls wurde der Inhibitor mit der niedrigsten Inhibitionskonstante aus der MCoTI Bibliothek II isoliert. Für die weitere Suche nach Miniproteininhibitoren gegen andere Proteasen lässt sich daraus schließen, dass das Einfügen einer, für die Hydrolyse von Proteinen spezifischen Aminosäuren in P1 Position des Inhibitors, im Falle von z.B. Chymotrypsin Tryptophan, Tyrosin oder Phenylalanin, die Wahrscheinlichkeit erhöht, hochaffine Inhibitoren gegen diese Proteasen zu isolieren.



---

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

---

In dieser Arbeit sollten neue Miniproteininhibitoren gegen die humane Typ II Transmembranserinprotease Matriptase (MT-SP1) mittels rationalen Protein Design oder gerichteter Evolution durch die Methode des *yeast surface display* gefunden werden.

Dazu gliederte sich die Arbeit in drei Teilbereiche. So sollte im ersten Abschnitt die Eignung der natürlichen MCoTI Varianten als Inhibitoren der Matriptase untersucht werden. Dazu wurden diese aus den Samen von *Momordica cochinchinensis* isoliert und die katalytische Domäne rekombinant in *E.coli* produziert und aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Inhibitionskonstanten gegen Matriptase. Dabei stellte sich MCoTI-II ( $K_{iapp}$  235 nM) als geeignetes Miniprotein heraus und wurde in den folgenden Abschnitten als *scaffold* für neue Inhibitoren verwendet.

Im zweiten Abschnitt wurden durch rationales Protein Design am Computer verschiedene Positionen im Miniprotein identifiziert und durch Peptidfestphasensynthese neue Aminosäuren an diesen Stellen eingefügt und auf ihre Inhibition gegen Matriptase hin untersucht um Varianten mit einer niedrigeren  $K_{iapp}$  zu erhalten. Diese Experimente lieferten jedoch keine Varianten des Miniproteins mit verbesserten Inhibitionseigenschaften und lassen diese Methode nur bedingt geeignet erscheinen, neue Proteaseinhibitoren basierend auf oMCoTI-II zu finden.

Im dritten Abschnitt wurden zunächst zwei unterschiedliche kombinatorische Bibliotheken auf Basis von oMCoTI-II mit Diversitäten von  $1 \times 10^7$  und  $2 \times 10^7$  in *S. cerevisiae* erzeugt. Die beiden Bibliotheken wurden im *yeast surface display* separat gegen Matriptase mittels *fluorescence asisted cell sorting* (FACS) mehreren Selektionsrunden unterzogen. Dabei wurde stetig die Antigenkonzentration verringert, um auf hochaffine Inhibitoren zu selektieren. In der anschließenden Analyse konnten mehrere Varianten mit unterschiedlichen Aminosäuresequenzen identifiziert werden. Daraus wurden einige Miniproteine ausgewählt, mittels Peptidfestphasensynthese dargestellt und ihre apparenten Inhibitionskonstanten bestimmt. Es konnten zwei Miniproteinvarianten mit hohen Affinitäten und unterschiedlichen Sequenzen gegen Matriptase ( $K_{iapp}$  3,7 und 8,7 nM) identifiziert werden.

Damit konnte erstmalig gezeigt werden, dass das *yeast surface display* eine geeignete Methode der gerichteten Evolution ist um neue Inhibitoren gegenüber den therapeutisch relevanten Typ II Transmembranserinproteasen zu identifizieren.

Mit Hilfe der beiden hochaffinen gefundenen Inhibitoren kann in weiteren Arbeiten ein Kristallkomplex mit MT-SP1 erzeugt werden, auf dessen Grundlage die Inhibition von Matriptase besser charakterisiert werden kann. Weiterhin können aus der Kristallstruktur auch chemische Moleküle dargestellt werden, die als Medikamente in der Krebstherapie in Frage kommen. Weitere Arbeiten könnten auch die Zyklisierung der neuen Inhibitoren betreffen, da wie bereits in dieser Arbeit gezeigt die zyklische Variante von MCoTI-II eine bessere Inhibitionskonstante zeigt als die lineare Version oMCoTI-II.

Ebenfalls können mit den erzeugten oMCoTI-II Bibliotheken einer Vielzahl andere Enzyme wie z.B Hepsin oder andere Proteasen aus der TTSP Familie durchmustert werden um Inhibitoren gegen diese wissenschaftlich interessanten Enzyme zu finden.

---

**Literaturverzeichnis**

---

- [1] X. S. Puente, L. M. Sanchez, C. M. Overall, C. Lopez-Otin *Nat Rev Genet.* **2003**, 4, 544-558.
- [2] N. D. Rawlings, D. P. Tolle, A. J. Barrett *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, D160-164.
- [3] F. Lottspeich, H. Zorbas, Bioanalytik, Spektrum akademischer Verlag, **1998**.
- [4] A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. J. Woessner, Handbook of Proteolytic Enzymes, Academic Amsterdam, **2004**.
- [5] S.-Y. Choi, S. Bertram, I. Glowacka, Y. W. Park, S. Pöhlmann *Trends in Molecular Medicine.* **2009**, 15, 303-312.
- [6] B. Turk *Nat Rev Drug Discov.* **2006**, 5, 785-799.
- [7] N. D. Rawlings, A. J. Barrett *Methods Enzymol.* **1994**, 244, 19-61.
- [8] E. S. Lander et al, *Nature.* **2001**, 409, 860-921.
- [9] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, Lehrbuch der Biochemie, WILEY-VCH, **2002**.
- [10] J. D. Robertus, R. A. Alden, J. J. Birktoft, J. Kraut, J. C. Powers, P. E. Wilcox *Biochemistry.* **1972**, 11, 2439-2449.
- [11] L. Hedstrom *Chem Rev.* **2002**, 102, 4501-4524.
- [12] I. Schechter, A. Berger *Biochem Biophys Res Commun.* **1967**, 27, 157-162.
- [13] J. J. Perona, C. S. Craik *Protein Sci.* **1995**, 4, 337-360.
- [14] D. Blow, The Enzymes, Academic Press, **1971**.
- [15] D. M. Shotton, H. C. Watson *Nature.* **1970**, 225, 811-816.
- [16] M. Krieger, L. M. Kay, R. M. Stroud *J Mol Biol.* **1974**, 83, 209-230.
- [17] W. Bode, D. Turk, A. Karshikov *Protein Sci.* **1992**, 1, 426-471.
- [18] W. Bode, E. Meyer, Jr., J. C. Powers *Biochemistry.* **1989**, 28, 1951-1963.
- [19] E. W. Davie, O. D. Ratnoff *Science.* **1964**, 145, 1310-1312.
- [20] R. G. Macfarlane *Nature.* **1964**, 202, 498-499.
- [21] E. W. Davie, H. Neurath *J Biol Chem.* **1955**, 212, 515-529.
- [22] E. W. Davie, K. Fujikawa, W. Kisiel *Biochemistry.* **1991**, 30, 10363-10370.
- [23] W. Bode, R. Huber *Biochim Biophys Acta.* **2000**, 1477, 241-252.
- [24] G. A. Silverman, P. I. Bird, R. W. Carrell, F. C. Church, P. B. Coughlin, P. G. Gettins, J. A. Irving, D. A. Lomas, C. J. Luke, R. W. Moyer, P. A. Pemberton, E. Remold-O'Donnell, G. S. Salvesen, J. Travis, J. C. Whisstock *J Biol Chem.* **2001**, 276, 33293-33296.
- [25] M. T. Stubbs, B. Laber, W. Bode, R. Huber, R. Jerala, B. Lenarcic, V. Turk *EMBO J.* **1990**, 9, 1939-1947.
- [26] F. X. Gomis-Ruth, K. Maskos, M. Betz, A. Bergner, R. Huber, K. Suzuki, N. Yoshida, H. Nagase, K. Brew, G. P. Bourenkov, H. Bartunik, W. Bode *Nature.* **1997**, 389, 77-81.
- [27] E. N. Shiozaki, J. Chai, D. J. Rigotti, S. J. Riedl, P. Li, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, R. Fairman, Y. Shi *Mol Cell.* **2003**, 11, 519-527.
- [28] K. Dano, J. Romer, B. S. Nielsen, S. Bjorn, C. Pyke, J. Rygaard, L. R. Lund *APMIS.* **1999**, 107, 120-127.
- [29] M. Johnsen, L. R. Lund, J. Romer, K. Almholt, K. Dano *Curr Opin Cell Biol.* **1998**, 10, 667-671.
- [30] T. J. de Vries, G. N. van Muijen, D. J. Ruiter *Pathol Res Pract.* **1996**, 192, 718-733.
- [31] S. A. Rabbani, A. P. Mazar *Surg Oncol Clin N Am.* **2001**, 10, 393-415, x.
- [32] E. C. Kohn, L. A. Liotta *Cancer Res.* **1995**, 55, 1856-1862.
- [33] W. T. Chen *Enzyme Protein.* **1996**, 49, 59-71.
- [34] J. Cheronis, Protease, protease inhibitors and protease derived peptides, Birkhäuser Verlag, Basel, **1993**.
- [35] S. Netzel-Arnett, J. D. Hooper, R. Szabo, E. L. Madison, J. P. Quigley, T. H. Bugge, T. M. Antalis *Cancer Metastasis Rev.* **2003**, 22, 237-258.
- [36] G. W. Wong, Y. Tang, E. Feyfant, A. Sali, L. Li, Y. Li, C. Huang, D. S. Friend, S. A. Krilis, R. L. Stevens *J Biol Chem.* **1999**, 274, 30784-30793.
- [37] G. H. Caughey, W. W. Raymond, J. L. Blount, L. W. Hau, M. Pallaoro, P. J. Wolters, G. M. Verghese *J Immunol.* **2000**, 164, 6566-6575.

- 
- [38] J. X. Yu, L. Chao, J. Chao *J Biol Chem.* **1994**, 269, 18843-18848.
- [39] J. X. Yu, L. Chao, J. Chao *J Biol Chem.* **1995**, 270, 13483-13489.
- [40] J. D. Hooper, N. Bowen, H. Marshall, L. M. Cullen, R. Sood, R. Daniels, M. A. Stuttgen, J. F. Normyle, D. R. Higgs, D. L. Kastner, S. M. Ogbourne, M. F. Pera, E. C. Jazwinska, T. M. Antalis *Biochim Biophys Acta.* **2000**, 1492, 63-71.
- [41] M. Inoue, M. Isobe, T. Itoyama, H. Kido *Biochem Biophys Res Commun.* **1999**, 266, 564-568.
- [42] J. D. Hooper, J. A. Clements, J. P. Quigley, T. M. Antalis *J Biol Chem.* **2001**, 276, 857-860.
- [43] Y. Kitamoto, R. A. Veile, H. Donis-Keller, J. E. Sadler *Biochemistry.* **1995**, 34, 4562-4568.
- [44] Y. Kitamoto, X. Yuan, Q. Wu, D. W. McCourt, J. E. Sadler *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1994**, 91, 7588-7592.
- [45] S. P. Leytus, K. R. Loeb, F. S. Hagen, K. Kurachi, E. W. Davie *Biochemistry.* **1988**, 27, 1067-1074.
- [46] A. Tsuji, A. Torres-Rosado, T. Arai, M. M. Le Beau, R. S. Lemons, S. H. Chou, K. Kurachi *J Biol Chem.* **1991**, 266, 16948-16953.
- [47] R. Szabo, T. H. Bugge *Int J Biochem Cell Biol.* **2008**, 40, 1297-1316.
- [48] M. S. Brown, J. Herz, J. L. Goldstein *Nature.* **1997**, 388, 629-630.
- [49] M. Z. Kounnas, F. C. Church, W. S. Argraves, D. K. Strickland *J Biol Chem.* **1996**, 271, 6523-6529.
- [50] A. Nykjaer, M. Conese, E. I. Christensen, D. Olson, O. Cremona, J. Gliemann, F. Blasi *EMBO J.* **1997**, 16, 2610-2620.
- [51] D. Resnick, J. E. Chatterton, K. Schwartz, H. Slayter, M. Krieger *J Biol Chem.* **1996**, 271, 26924-26930.
- [52] P. Bork, G. Beckmann *J Mol Biol.* **1993**, 231, 539-545.
- [53] P. Bork, L. Patthy *Protein Sci.* **1995**, 4, 1421-1425.
- [54] G. Beckmann, P. Bork *Trends Biochem Sci.* **1993**, 18, 40-41.
- [55] K. M. Cadigan, R. Nusse *Genes Dev.* **1997**, 11, 3286-3305.
- [56] G. Velasco, S. Cal, V. Quesada, L. M. Sanchez, C. Lopez-Otin *J Biol Chem.* **2002**, 277, 37637-37646.
- [57] T. K. Vu, R. W. Liu, C. J. Haaksma, J. J. Tomasek, E. W. Howard *J Biol Chem.* **1997**, 272, 31315-31320.
- [58] T. Takeuchi, M. A. Shuman, C. S. Craik *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1999**, 96, 11054-11061.
- [59] J. D. Hooper, A. L. Scarman, B. E. Clarke, J. F. Normyle, T. M. Antalis *Eur J Biochem.* **2000**, 267, 6931-6937.
- [60] W. Yan, N. Sheng, M. Seto, J. Morser, Q. Wu *J Biol Chem.* **1999**, 274, 14926-14935.
- [61] N. Yamaguchi, A. Okui, T. Yamada, H. Nakazato, S. Mitsui *J Biol Chem.* **2002**, 277, 6806-6812.
- [62] M. Takahashi, T. Sano, K. Yamaoka, T. Kamimura, N. Umemoto, H. Nishitani, S. Yasuoka *Histochem Cell Biol.* **2001**, 115, 181-187.
- [63] K. Yamaoka, K. Masuda, H. Ogawa, K. Takagi, N. Umemoto, S. Yasuoka *J Biol Chem.* **1998**, 273, 11895-11901.
- [64] J. C. Lang, D. E. Schuller *Br J Cancer.* **2001**, 84, 237-243.
- [65] O. Dery, N. W. Bunnett *Biochem Soc Trans.* **1999**, 27, 246-254.
- [66] M. D. Hollenberg *Trends Pharmacol Sci.* **1999**, 20, 271-273.
- [67] W. Kong, K. McConalogue, L. M. Khitin, M. D. Hollenberg, D. G. Payan, S. K. Bohm, N. W. Bunnett *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1997**, 94, 8884-8889.
- [68] A. Torres-Rosado, K. S. O'Shea, A. Tsuji, S. H. Chou, K. Kurachi *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1993**, 90, 7181-7185.
- [69] A. B. Bicknell, K. Lomthaisong, R. J. Woods, E. G. Hutchinson, H. P. Bennett, R. T. Gladwell, P. J. Lowry *Cell.* **2001**, 105, 903-912.
- [70] T. Takeuchi *Journal of Biological Chemistry.* **2000**, 275, 26333-26342.
- [71] Z. Chen, Z. Fan, J. E. McNeal, R. Nolley, M. C. Caldwell, M. Mahadevappa, Z. Zhang, J. A. Warrington, T. A. Stamey *J Urol.* **2003**, 169, 1316-1319.
- [72] P. P. Sedghizadeh, S. R. Mallery, S. J. Thompson, L. Kresty, F. M. Beck, E. K. Parkinson, J. Biancamano, J. C. Lang *Head Neck.* **2006**, 28, 432-440.
-

- [73] Y. E. Shi, J. Torri, L. Yieh, A. Wellstein, M. E. Lippman, R. B. Dickson *Cancer Res.* **1993**, 53, 1409-1415.
- [74] H. Tanimoto, L. J. Underwood, K. Shigemasa, T. H. Parmley, Y. Wang, Y. Yan, J. Clarke, T. J. O'Brien *Tumour Biol.* **1999**, 20, 88-98.
- [75] Y. Zhang, R. Siebert, P. Matthiesen, Y. Yang, H. Ha, B. Schlegelberger *Genomics.* **1998**, 51, 309-311.
- [76] M. G. Kim, C. Chen, M. S. Lyu, E. G. Cho, D. Park, C. Kozak, R. H. Schwartz *Immunogenetics.* **1999**, 49, 420-428.
- [77] M. D. Oberst, B. Singh, M. Ozdemirli, R. B. Dickson, M. D. Johnson, C. Y. Lin *J Histochem Cytochem.* **2003**, 51, 1017-1025.
- [78] K. List, R. Szabo, A. Molinolo, B. S. Nielsen, T. H. Bugge *Am J Pathol.* **2006**, 168, 1513-1525.
- [79] K. List, C. C. Haudenschild, R. Szabo, W. Chen, S. M. Wahl, W. Swaim, L. H. Engelholm, N. Behrendt, T. H. Bugge *Oncogene.* **2002**, 21, 3765-3779.
- [80] H. Tanimoto, L. J. Underwood, Y. Wang, K. Shigemasa, T. H. Parmley, T. J. O'Brien *Tumour Biol.* **2001**, 22, 104-114.
- [81] C. Y. Lin, J. Anders, M. Johnson, Q. A. Sang, R. B. Dickson *J Biol Chem.* **1999**, 274, 18231-18236.
- [82] M. D. Oberst, L. Y. Chen, K. Kiyomiya, C. A. Williams, M. S. Lee, M. D. Johnson, R. B. Dickson, C. Y. Lin *Am J Physiol Cell Physiol.* **2005**, 289, C462-470.
- [83] C. Kim, Y. Cho, C. H. Kang, M. G. Kim, H. Lee, E. G. Cho, D. Park *EMBO Rep.* **2005**, 6, 1045-1051.
- [84] M. S. Lee, K. Kiyomiya, C. Benaud, R. B. Dickson, C. Y. Lin *Am J Physiol Cell Physiol.* **2005**, 288, C932-941.
- [85] K. List, T. H. Bugge, R. Szabo *Mol Med.* **2006**, 12, 1-7.
- [86] M. D. Oberst *Journal of Biological Chemistry.* **2003**, 278, 26773-26779.
- [87] E. G. Cho, M. G. Kim, C. Kim, S. R. Kim, I. S. Seong, C. Chung, R. H. Schwartz, D. Park *J Biol Chem.* **2001**, 276, 44581-44589.
- [88] R. Friedrich *Journal of Biological Chemistry.* **2001**, 277, 2160-2168.
- [89] S. L. Lee *Journal of Biological Chemistry.* **2000**, 275, 36720-36725.
- [90] S. Satomi, Y. Yamasaki, S. Tsuzuki, Y. Hitomi, T. Iwanaga, T. Fushiki *Biochem Biophys Res Commun.* **2001**, 287, 995-1002.
- [91] S. Ahmed, X. Jin, M. Yagi, C. Yasuda, Y. Sato, S. Higashi, C. Y. Lin, R. B. Dickson, K. Miyazaki *FEBS J.* **2006**, 273, 615-627.
- [92] K. List, R. Szabo, P. W. Wertz, J. Segre, C. C. Haudenschild, S. Y. Kim, T. H. Bugge *J Cell Biol.* **2003**, 163, 901-910.
- [93] L. A. Liotta, R. H. Goldfarb, R. Brundage, G. P. Siegal, V. Terranova, S. Garbisa *Cancer Res.* **1981**, 41, 4629-4636.
- [94] P. J. Gaffney *Haemostasis.* **1977**, 6, 2-25.
- [95] K. Uhland *Cellular and Molecular Life Sciences.* **2006**, 63, 2968-2978.
- [96] L. Naldini, K. M. Weidner, E. Vigna, G. Gaudino, A. Bardelli, C. Ponzetto, R. P. Narsimhan, G. Hartmann, R. Zarnegar, G. K. Michalopoulos, et al. *EMBO J.* **1991**, 10, 2867-2878.
- [97] R. Zarnegar, G. K. Michalopoulos *J Cell Biol.* **1995**, 129, 1177-1180.
- [98] N. Sidenius, F. Blasi *Cancer Metastasis Rev.* **2003**, 22, 205-222.
- [99] L. Trusolino, P. M. Comoglio *Nat Rev Cancer.* **2002**, 2, 289-300.
- [100] D. Forbes, S. Thiel, M. C. Stella, A. Sturzebecher, A. Schweinitz, T. Steinmetzer, J. Sturzebecher, K. Uhland *Int J Oncol.* **2005**, 27, 1061-1070.
- [101] K. List, R. Szabo, A. Molinolo, V. Sriuranpong, V. Redeye, T. Murdock, B. Burke, B. S. Nielsen, J. S. Gutkind, T. H. Bugge *Genes Dev.* **2005**, 19, 1934-1950.
- [102] J. S. Jin, D. S. Hsieh, S. H. Loh, A. Chen, C. W. Yao, C. Y. Yen *Mod Pathol.* **2006**, 19, 447-452.
- [103] A. D. Santin, F. Zhan, S. Bellone, M. Palmieri, S. Cane, E. Bignotti, S. Anfossi, M. Gokden, D. Dunn, J. J. Roman, T. J. O'Brien, E. Tian, M. J. Cannon, J. Shaughnessy, Jr., S. Pecorelli *Int J Cancer.* **2004**, 112, 14-25.
- [104] A. V. Galkin, L. Mullen, W. D. Fox, J. Brown, D. Duncan, O. Moreno, E. L. Madison, D. B. Agus *The Prostate.* **2004**, 61, 228-235.

- 
- [105] T. Steinmetzer, A. Schweinitz, A. Stürzebecher, D. Dönnecke, K. Uhland, O. Schuster, P. Steinmetzer, F. Müller, R. Friedrich, M. E. Than, W. Bode, J. Stürzebecher *Journal of Medicinal Chemistry*. **2006**, 49, 4116-4126.
- [106] A. A. Stoop, C. S. Craik *Nat Biotechnol*. **2003**, 21, 1063-1068.
- [107] A. Desilets, J. Longpre, M. Beaulieu, R. Leduc *FEBS Letters*. **2006**, 580, 2227-2232.
- [108] P. Li, S. Jiang, S.-L. Lee, C. Y. Lin, M. D. Johnson, R. B. Dickson, C. J. Michejda, P. P. Roller *Journal of Medicinal Chemistry*. **2007**, 50, 5976-5983.
- [109] Y. Q. Long, S. L. Lee, C. Y. Lin, I. J. Enyedy, S. Wang, P. Li, R. B. Dickson, P. P. Roller *Bioorg Med Chem Lett*. **2001**, 11, 2515-2519.
- [110] J. Sun, J. Pons, C. S. Craik *Biochemistry*. **2003**, 42, 892-900.
- [111] D. J. Craik, N. L. Daly, T. Bond, C. Waine *J Mol Biol*. **1999**, 294, 1327-1336.
- [112] J. P. Tam, Y. A. Lu, J. L. Yang, K. W. Chiu *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1999**, 96, 8913-8918.
- [113] H. Terlau, B. M. Olivera *Physiol Rev*. **2004**, 84, 41-68.
- [114] L. Gran *Lloydia*. **1973**, 36, 209-210.
- [115] A. Heitz, L. Chiche, D. Le-Nguyen, B. Castro *Biochemistry*. **1989**, 28, 2392-2398.
- [116] D. Le-Nguyen, H. Matras, M. A. Coletti-Previero, B. Castro *Biochem Biophys Res Commun*. **1989**, 162, 1425-1430.
- [117] O. Avrutina, Dissertation, Göttingen, **2005**.
- [118] N. Q. McDonald, W. A. Hendrickson *Cell*. **1993**, 73, 421-424.
- [119] D. R. Holland, L. S. Cousens, W. Meng, B. W. Matthews *J Mol Biol*. **1994**, 239, 385-400.
- [120] M. P. Schlunegger, M. G. Grutter *Nature*. **1992**, 358, 430-434.
- [121] C. Oefner, A. D'Arcy, F. K. Winkler, B. Eggimann, M. Hosang *EMBO J*. **1992**, 11, 3921-3926.
- [122] P. K. Pallaghy, K. J. Nielsen, D. J. Craik, R. S. Norton *Protein Sci*. **1994**, 3, 1833-1839.
- [123] A. Favel, H. Matras, M. A. Coletti-Previero, R. Zwillig, E. A. Robinson, B. Castro *Int J Pept Protein Res*. **1989**, 33, 202-208.
- [124] J. C. Gelly, J. Gracy, Q. Kaas, D. Le-Nguyen, A. Heitz, L. Chiche *Nucleic Acids Res*. **2004**, 32, D156-159.
- [125] L. Chiche, A. Heitz, J. C. Gelly, J. Gracy, P. T. Chau, P. T. Ha, J. F. Hernandez, D. Le-Nguyen *Curr Protein Pept Sci*. **2004**, 5, 341-349.
- [126] D. C. Ireland, M. L. Colgrave, D. J. Craik *Biochem J*. **2006**, 400, 1-12.
- [127] M. L. Colgrave, D. J. Craik *Biochemistry*. **2004**, 43, 5965-5975.
- [128] M. Werle, K. Kafedjiiski, H. Kolmar, A. Bernkop-Schnurch *Int J Pharm*. **2007**, 332, 72-79.
- [129] H. U. Schmoldt, Dissertation, Göttingen, **2005**.
- [130] D. J. Craik, N. L. Daly, C. Waine *Toxicon*. **2001**, 39, 43-60.
- [131] D. J. Craik, S. Simonsen, N. L. Daly *Curr Opin Drug Discov Devel*. **2002**, 5, 251-260.
- [132] H. Kolmar *FEBS J*. **2008**, 275, 2684-2690.
- [133] A. Christmann, K. Walter, A. Wentzel, R. Kratzner, H. Kolmar *Protein Eng*. **1999**, 12, 797-806.
- [134] A. Wentzel, A. Christmann, R. Kratzner, H. Kolmar *J Biol Chem*. **1999**, 274, 21037-21043.
- [135] K. Hilpert, H. Wessner, J. Schneider-Mergener, K. Welfle, R. Misselwitz, H. Welfle, A. C. Hocke, S. Hippenstiel, W. Hohne *J Biol Chem*. **2003**, 278, 24986-24993.
- [136] M. E. Felizmenio-Quimio, N. L. Daly, D. J. Craik *J Biol Chem*. **2001**, 276, 22875-22882.
- [137] A. Heitz, J. F. Hernandez, J. Gagnon, T. T. Hong, T. T. Pham, T. M. Nguyen, D. Le-Nguyen, L. Chiche *Biochemistry*. **2001**, 40, 7973-7983.
- [138] J. F. Hernandez, J. Gagnon, L. Chiche, T. M. Nguyen, J. P. Andrieu, A. Heitz, T. Trinh Hong, T. T. Pham, D. Le Nguyen *Biochemistry*. **2000**, 39, 5722-5730.
- [139] O. Avrutina, H.-U. Schmoldt, D. Gabriëlcic-Geiger, D. Le Nguyen, C. P. Sommerhoff, U. Diederichsen, H. Kolmar *Biological Chemistry*. **2005**, 386, 1301-1306.
- [140] C. P. Sommerhoff, O. Avrutina, H.-U. Schmoldt, D. Gabriëlcic-Geiger, U. Diederichsen, H. Kolmar *Journal of Molecular Biology*. **2010**, 395, 167-175.
- [141] P. Thongyoo, C. Bonomelli, R. J. Leatherbarrow, E. W. Tate *J Med Chem*. **2009**, 52, 6197-6200.
- [142] P. Thongyoo, N. Roque-Rosell, R. J. Leatherbarrow, E. W. Tate *Org Biomol Chem*. **2008**, 6, 1462-1470.
-

- 
- [143] M. Tomaszowski, Diplomarbeit, TU Darmstadt, **2007**.
- [144] K. M. Ulmer *Science*. **1983**, 219, 666-671.
- [145] C. Pabo *Nature*. **1983**, 301, 200.
- [146] U. T. Bornscheuer, M. Pohl *Curr Opin Chem Biol*. **2001**, 5, 137-143.
- [147] L. Regan *Curr Opin Struct Biol*. **1999**, 9, 494-499.
- [148] H. L. Liu, J. P. Hsu *Proteomics*. **2005**, 5, 2056-2068.
- [149] D. D. Ryu, D. H. Nam *Biotechnol Prog*. **2000**, 16, 2-16.
- [150] T. A. Kunkel *Curr Protoc Mol Biol*. **2001**, Chapter 8, Unit8 1.
- [151] F. Cedrone, A. Menez, E. Quemeneur *Curr Opin Struct Biol*. **2000**, 10, 405-410.
- [152] K. Hult, P. Berglund *Curr Opin Biotechnol*. **2003**, 14, 395-400.
- [153] E. Alm, A. V. Morozov, T. Kortemme, D. Baker *J Mol Biol*. **2002**, 322, 463-476.
- [154] H. P. Stuble, E. Kombrink *J Biol Chem*. **2001**, 276, 26893-26897.
- [155] C. S. Craik, C. Largman, T. Fletcher, S. Roczniak, P. J. Barr, R. Fletterick, W. J. Rutter *Science*. **1985**, 228, 291-297.
- [156] E. D. Getzoff, D. E. Cabelli, C. L. Fisher, H. E. Parge, M. S. Viezzoli, L. Banci, R. A. Hallewell *Nature*. **1992**, 358, 347-351.
- [157] D. Rotticci, J. C. Rotticci-Mulder, S. Denman, T. Norin, K. Hult *ChemBioChem*. **2001**, 2, 766-770.
- [158] C. Branneby, P. Carlqvist, A. Magnusson, K. Hult, T. Brinck, P. Berglund *J Am Chem Soc*. **2003**, 125, 874-875.
- [159] K. Matsumoto, B. G. Davis, J. B. Jones *Chemistry*. **2002**, 8, 4129-4137.
- [160] S. Reiss, M. Sieber, V. Oberle, A. Wentzel, P. Spangenberg, R. Claus, H. Kolmar, W. Losche *Platelets*. **2006**, 17, 153-157.
- [161] S. Krause, H. U. Schmoldt, A. Wentzel, M. Ballmaier, K. Friedrich, H. Kolmar *FEBS J*. **2007**, 274, 86-95.
- [162] S. E. Cwirla, P. Balasubramanian, D. J. Duffin, C. R. Wagstrom, C. M. Gates, S. C. Singer, A. M. Davis, R. L. Tansik, L. C. Mattheakis, C. M. Boytos, P. J. Schatz, D. P. Baccanari, N. C. Wrighton, R. W. Barrett, W. J. Dower *Science*. **1997**, 276, 1696-1699.
- [163] J. Kaur, R. Sharma *Crit Rev Biotechnol*. **2006**, 26, 165-199.
- [164] T. W. Wang, H. Zhu, X. Y. Ma, T. Zhang, Y. S. Ma, D. Z. Wei *Mol Biotechnol*. **2006**, 34, 55-68.
- [165] M. B. Tobin, C. Gustafsson, G. W. Huisman *Curr Opin Struct Biol*. **2000**, 10, 421-427.
- [166] O. Kuchner, F. H. Arnold *Trends Biotechnol*. **1997**, 15, 523-530.
- [167] R. R. Chirumamilla, R. Muralidhar, R. Marchant, P. Nigam *Mol Cell Biochem*. **2001**, 224, 159-168.
- [168] C. Zahnd, S. Spinelli, B. Luginbuhl, P. Amstutz, C. Cambillau, A. Pluckthun *J Biol Chem*. **2004**, 279, 18870-18877.
- [169] D. R. Mills, R. L. Peterson, S. Spiegelman *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1967**, 58, 217-224.
- [170] B. L. Roberts, W. Markland, A. C. Ley, R. B. Kent, D. W. White, S. K. Guterman, R. C. Ladner *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1992**, 89, 2429-2433.
- [171] R. Baggio, P. Burgstaller, S. P. Hale, A. R. Putney, M. Lane, D. Lipovsek, M. C. Wright, R. W. Roberts, R. Liu, J. W. Szostak, R. W. Wagner *J Mol Recognit*. **2002**, 15, 126-134.
- [172] C. Souriau, L. Chiche, R. Irving, P. Hudson *Biochemistry*. **2005**, 44, 7143-7155.
- [173] H. Tao, V. W. Cornish *Curr Opin Chem Biol*. **2002**, 6, 858-864.
- [174] P. Amstutz, P. Forrer, C. Zahnd, A. Pluckthun *Curr Opin Biotechnol*. **2001**, 12, 400-405.
- [175] J. Hanes, A. Pluckthun *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1997**, 94, 4937-4942.
- [176] R. W. Roberts, J. W. Szostak *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1997**, 94, 12297-12302.
- [177] T. Lamla, V. A. Erdmann *FEBS Lett*. **2001**, 502, 35-40.
- [178] G. Winter, A. D. Griffiths, R. E. Hawkins, H. R. Hoogenboom *Annu Rev Immunol*. **1994**, 12, 433-455.
- [179] P. Samuelson, E. Gunneriusson, P. A. Nygren, S. Stahl *J Biotechnol*. **2002**, 96, 129-154.
- [180] E. T. Boder, K. D. Wittrup *Nat Biotechnol*. **1997**, 15, 553-557.
- [181] G. P. Smith *Science*. **1985**, 228, 1315-1317.
- [182] G. P. Smith, V. A. Petrenko *Chem Rev*. **1997**, 97, 391-410.
-

- 
- [183] C. Santini, D. Brennan, C. Mennuni, R. H. Hoess, A. Nicosia, R. Cortese, A. Luzzago *J Mol Biol.* **1998**, 282, 125-135.
- [184] Z. Ren, L. W. Black *Gene.* **1998**, 215, 439-444.
- [185] S. Bass, R. Greene, J. A. Wells *Proteins.* **1990**, 8, 309-314.
- [186] A. Charbit, J. C. Boulain, A. Ryter, M. Hofnung *EMBO J.* **1986**, 5, 3029-3037.
- [187] S. Y. Lee, J. H. Choi, Z. Xu *Trends Biotechnol.* **2003**, 21, 45-52.
- [188] A. Wentzel, Dissertation, **2003**.
- [189] D. W. Colby, B. A. Kellogg, C. P. Graff, Y. A. Yeung, J. S. Swers, K. D. Wittrup *Methods Enzymol.* **2004**, 388, 348-358.
- [190] J. M. Weaver-Feldhaus, J. Lou, J. R. Coleman, R. W. Siegel, J. D. Marks, M. J. Feldhaus *FEBS Lett.* **2004**, 564, 24-34.
- [191] T. van den Beucken, H. Pieters, M. Steukers, M. van der Vaart, R. C. Ladner, H. R. Hoogenboom, S. E. Hufton *FEBS Lett.* **2003**, 546, 288-294.
- [192] D. W. Colby, P. Garg, T. Holden, G. Chao, J. M. Webster, A. Messer, V. M. Ingram, K. D. Wittrup *J Mol Biol.* **2004**, 342, 901-912.
- [193] C. P. Graff, K. Chester, R. Begent, K. D. Wittrup *Protein Eng Des Sel.* **2004**, 17, 293-304.
- [194] A. Razai, C. Garcia-Rodriguez, J. Lou, I. N. Geren, C. M. Forsyth, Y. Robles, R. Tsai, T. J. Smith, L. A. Smith, R. W. Siegel, M. Feldhaus, J. D. Marks *J Mol Biol.* **2005**, 351, 158-169.
- [195] M. C. Kieke, E. V. Shusta, E. T. Boder, L. Teyton, K. D. Wittrup, D. M. Kranz *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1999**, 96, 5651-5656.
- [196] M. C. Kieke, E. Sundberg, E. V. Shusta, R. A. Mariuzza, K. D. Wittrup, D. M. Kranz *J Mol Biol.* **2001**, 307, 1305-1315.
- [197] P. D. Holler, P. O. Holman, E. V. Shusta, S. O'Herrin, K. D. Wittrup, D. M. Kranz *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000**, 97, 5387-5392.
- [198] E. T. Boder, K. S. Midelfort, K. D. Wittrup *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000**, 97, 10701-10705.
- [199] S. Park, Y. Xu, X. F. Stowell, F. Gai, J. G. Saven, E. T. Boder *Protein Eng Des Sel.* **2006**, 19, 211-217.
- [200] Y. S. Kim, R. Bhandari, J. R. Cochran, J. Kuriyan, K. D. Wittrup *Proteins.* **2006**, 62, 1026-1035.
- [201] B. J. Hackel, A. Kapila, K. Dane Wittrup *Journal of Molecular Biology.* **2008**, 381, 1238-1252.
- [202] A. Silverman, A. Levin, J. Lahti, J. Cochran *Journal of Molecular Biology.* **2009**, 385, 1064-1075.
- [203] R. H. Kimura, A. M. Levin, F. V. Cochran, J. R. Cochran *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* **2009**, 77, 359-369.
- [204] J. L. Lahti, A. P. Silverman, J. R. Cochran *PLoS Comput Biol.* **2009**, 5, e1000499.
- [205] L. R. Pepper, Y. K. Cho, E. T. Boder, E. V. Shusta *Comb Chem High Throughput Screen.* **2008**, 11, 127-134.
- [206] J. J. VanAntwerp, K. D. Wittrup *Biotechnol Prog.* **2000**, 16, 31-37.
- [207] E. V. Shusta, M. C. Kieke, E. Parke, D. M. Kranz, K. D. Wittrup *J Mol Biol.* **1999**, 292, 949-956.
- [208] E. V. Shusta, P. D. Holler, M. C. Kieke, D. M. Kranz, K. D. Wittrup *Nat Biotechnol.* **2000**, 18, 754-759.
- [209] S. A. Gai, K. D. Wittrup *Curr Opin Struct Biol.* **2007**, 17, 467-473.
- [210] M. J. Feldhaus, R. W. Siegel, L. K. Opresko, J. R. Coleman, J. M. Feldhaus, Y. A. Yeung, J. R. Cochran, P. Heinzelman, D. Colby, J. Swers, C. Graff, H. S. Wiley, K. D. Wittrup *Nat Biotechnol.* **2003**, 21, 163-170.
- [211] L. Benatuil, J. M. Perez, J. Belk, C. M. Hsieh *Protein Engineering Design and Selection.* **2010**, 23, 155-159.
- [212] J. Cochran *Journal of Immunological Methods.* **2004**, 287, 147-158.
- [213] N. Weber, Diplomarbeit, TU Darmstadt, **2010**.
- [214] W. J. Dower, J. F. Miller, C. W. Ragsdale *Nucleic Acids Res.* **1988**, 16, 6127-6145.
- [215] G. Chao, W. L. Lau, B. J. Hackel, S. L. Sazinsky, S. M. Lippow, K. D. Wittrup *Nature Protocols.* **2006**, 1, 755-768.
- [216] K. B. Mullis, F. A. Faloona *Methods Enzymol.* **1987**, 155, 335-350.
-

- 
- [217] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich *Science*. **1988**, 239, 487-491.
- [218] R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim *Science*. **1985**, 230, 1350-1354.
- [219] H. Schagger *Nat Protoc*. **2006**, 1, 16-22.
- [220] U. K. Laemmli *Nature*. **1970**, 227, 680-685.
- [221] T. S. Meyer, B. L. Lamberts *Biochim Biophys Acta*. **1965**, 107, 144-145.
- [222] C. N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, T. Gray *Protein Sci*. **1995**, 4, 2411-2423.
- [223] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage *Nature*. **1975**, 258, 598-599.
- [224] A. Kanamoria, N. Senoa, I. Matsumotoa *Journal of Chromatography A*. **1986**, 363, 231.
- [225] D. V. Tambourgi, G. B. Ogden, B. F. Hall, W. D. da Silva, T. L. Kipnis *Trop Med Parasitol*. **1993**, 44, 91-94.
- [226] N. M. Green, E. J. Toms *Biochem J*. **1970**, 118, 67-70.
- [227] T. Chase, Jr., E. Shaw *Biochem Biophys Res Commun*. **1967**, 29, 508-514.
- [228] J. C. Zahnley, J. G. Davis *Biochemistry*. **1970**, 9, 1428-1433.
- [229] G. W. Jameson, D. V. Roberts, R. W. Adams, W. S. Kyle, D. T. Elmore *Biochem J*. **1973**, 131, 107-117.
- [230] R. Lottenberg, U. Christensen, C. M. Jackson, P. L. Coleman *Methods Enzymol*. **1981**, 80 Pt C, 341-361.
- [231] J. F. Morrison *Biochim Biophys Acta*. **1969**, 185, 269-286.
- [232] J. G. Bieth *Bull Eur Physiopathol Respir*. **1980**, 16 Suppl, 183-197.
- [233] A. A. Virgilio, J. A. Ellman *J. Am. Chem. Soc*. **1994**, 116, 11580.
- [234] W. C. Chan, P. D. White, Fmoc Solid Phase Peptide synthesis. A practical Approach, Oxford, University press, **2000**.
- [235] E. Atherton, D. L. J. Clive, R. C. Sheppard *J. Am. Chem. Soc*. **1975**, 97, 6584.
- [236] G. B. Fields, C. G. Fields *J. Am. Chem. Soc*. **1991**, 113, 4202.
- [237] J. M. Collins, N. E. Leadbeater *Org Biomol Chem*. **2007**, 5, 1141-1150.
- [238] K. Kojima, S. Tsuzuki, T. Fushiki, K. Inouye *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **2009**, 73, 454-456.
- [239] R. Kratzner, J. E. Debreczeni, T. Pape, T. R. Schneider, A. Wentzel, H. Kolmar, G. M. Sheldrick, I. Uson *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. **2005**, 61, 1255-1262.
- [240] A. Heitz, O. Avrutina, D. Le-Nguyen, U. Diederichsen, J. F. Hernandez, J. Gracy, H. Kolmar, L. Chiche *BMC Struct Biol*. **2008**, 8, 54.
- [241] A. Kayushin, M. Korosteleva, A. Miroshnikov *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. **2000**, 19, 1967-1976.
- [242] G. E. Crooks, G. Hon, J. M. Chandonia, S. E. Brenner *Genome Res*. **2004**, 14, 1188-1190.
- [243] T. Steinmetzer, D. Dönnecke, M. Korsonewski, C. Neuwirth, P. Steinmetzer, A. Schulze, S. M. Saupe, A. Schweinitz *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2009**, 19, 67-73.
- [244] C. Liebecq *International Union of Biochemistry. London: The Biochemical Society*. **1978**.



## Abkürzungsverzeichnis

Die verwendeten ein- und dreibuchstabigen Abkürzungen für Aminosäuren, sowie alle verwendeten physikalischen Größen entsprechen der Konvention der *International Union for Biochemistry*.<sup>[244]</sup>

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
C-Terminus	Carboxyterminus
ca.	circa
Cam <sup>r</sup>	Chloramphenicolresistenz
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dYT	<i>double Yeast Tryptone</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EETI	<i>Ecballium Elaterium Trypsine Inhibitor</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>fluorescence assisted cell sorting</i>
FITC	fluoresceinisothiocyanid
g	Gramm
G	Guanin
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphate
HBTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphate
HCTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -6-chlorobenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat

---

HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
k	Kilo
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
Kan <sup>r</sup>	Kanamycinresistenz
K <sub>i</sub>	Inhibitionskonstante
K <sub>iapp</sub>	apparente Inhibitionskonstant
K <sub>M</sub>	Michael Menten Konstante
L	Liter
m	Milli (10 <sup>-3</sup> )
$\mu$	Micro (10 <sup>-6</sup> )
M	Molar (Mol/Liter)
MACS	<i>magnetic assisted cell sorting</i>
MCoTI	<i>Momordica cochinchinensis trypsine inhibitor</i>
MFU	<i>mean fluorescence unit</i>
min	Minute
MMP	Matrix-Metalloprotease
mol	Mol
MWCO	<i>Molecular Weight CutOff</i>
n	Nano (10 <sup>-9</sup> )
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
N-Terminus	Aminotерminus
o	offenkettig
OD	Optische Dichte
p	Pico (10 <sup>-12</sup> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (~20°C)
s	Sekunde
SAPE	Streptavidin Phycoerythrin Konjugat
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

---

---

SDS	Natriumdodecylsulfat
SV	Säulenvolumen
T	Thymin
SPPS	solid-phase peptide synthesis
TFA	Trifluoressigsäure
t	Zeit
Tab	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TTSP	Typ II Transmembranserineprotease
uPA	Urokinase Plasminogen Aktivator
V	Volt
Vol	Volumen
W	Watt
YSD	<i>yeast surface display</i>
z.B.	zum Beispiel

## Abbildungen

Für alle nicht selbstständig erstellten Abbildungen ist eine Verwendung durch den jeweiligen Urheber, durch den Verlag oder durch das Copyright Clearance Center (222 Rosewood Drive Danvers, MA 01923 USA, <http://www.copyright.com>) für den Gebrauch in einer Dissertation genehmigt.

Für folgende Abbildungen wurden Lizenznummern durch das Copyright Clearance Center erhalten:

[Abb. 1.2]	12893591483004
[Abb. 1.3]	2893610290742
[Abb. 1.5]	2893640780100
[Abb. 1.9]	2893660149835

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen und Präsentationen

García Boy R, Mier W, Nothelfer EM, Altmann A, Eisenhut M, Kolmar H, Tomaszowski M, Krämer S, Haberkorn U., “Sunflower Trypsin Inhibitor 1 Derivatives as Molecular Scaffolds for the Development of Novel Peptidic Radio-pharmaceuticals”, Mol Imaging Biol (2009)  
DOI 10.1007/s11307-009-0287-z

Glotzbach B\*, Tomaszowski M\*, Weber N, Reinwarth M, Kolmar H, “New high affinity inhibitors of MT-SP1 using a combinatorial library of MCoTI-II”, Artikel in Vorbereitung. \*Gleicher Beitrag

Reinwarth M, Glotzbach B, Tomaszowski M, Fabritz S, Avrutina O, Kolmar H, “A generic system for oxidative folding and aminoterminal functionalization of cystine-knot peptides”, Artikel in Vorbereitung.

9tes deutsches Peptidsymposium, Göttingen, 2009 M. Tomaszowski, O. Avrutina and H. Kolmar, “Microwave irradiation in the synthesis of functional peptides: Fmoc-SPPS of substituted knottins”

8es deutsches Peptidsymposium, Heidelberg, 2007 O. Avrutina, M. Tomaszowski, H. – U. Schmoldt, A. Wentzel, D. Garijelic-Geiger, C. P. Sommerhoff, U. Diederichsen, H. Kolmar, “Engineered Cyclic Cystine Knot Peptides via Combined Recombinant and Chemical Synthesis”

## Danksagung

Diese Dissertation wäre ohne die Unterstützung vieler Personen nicht möglich gewesen. Ich möchte mich bei folgenden Personen bedanken:

Zu aller erst bei Prof. Dr. Harald Kolmar, für die Ermöglichung der Dissertation innerhalb seiner Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des Themas sowie die konstruktiven Diskussionen und die Geduld beim zusammenschreiben und korrigieren dieser Arbeit.

Prof. Dr. Katja Schmitz danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Dr. Olga Avrutina, für die Betreuung im Bereich der Peptidchemie und Dr. Andreas Christmann für die Betreuung in allen biologischen Bereichen und der Einführung in die Arbeitsweise mit FACS Geräten.

Allen Kooperationspartnern der Firma Merck KGaA für die Bereitstellung von Materialien und Protokollen zur Produktion von Matriptase, sowie für ihren Beitrag zur Finanzierung dieses Projektes.

Den Mitarbeitern der MS-Abteilung im Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie an der Technischen Universität Darmstadt für die MS-Spektren.

Weiterer Dank gilt Bernhard Glotzbach und Niklas Weber für die sehr gute Zusammenarbeit im Bereich der gerichteten Evolution und Unterstützung bei Herstellung der Bibliotheken. Ebenso möchte ich mich bei Michael Reinwarth und Martin Empting für deren Unterstützung in der Peptidsynthese bedanken.

Allen weiteren wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Mitarbeitern, Doktoranden, Technischen Angestellten, und Diplomanden in der Arbeitsgruppe für die gute Atmosphäre während und auch außerhalb der Arbeitszeiten. Insbesondere bedanke ich mich bei Stefanie Heil, Franziska Lang, Barbara Diestelmann, Simone Bartl-Zimmermann und Janine Fritz.

Meinen Eltern, meinen beiden Brüdern und meiner ganzen Familie, ohne ihre bedingungslose Unterstützung wäre das alles nicht möglich gewesen.

Ganz besonderer Dank gilt Kristin, für einfach alles.

### **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben

Darmstadt, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Michael Tomaszowski

### **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, daß ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Darmstadt, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Michael Tomaszowski

---

**Lebenslauf**

**Name:** Michael Marko Tomaszowski

**Geburtsdatum:** 16.07.1980

**Geburtsort:** Langen

**Staatsangehörigkeit:** deutsch

**Familienstand:** ledig

**Schulbildung:** 1987 - 1991 Bürgerhausschule Grundschule, Rodgau  
1991 - 1997 Georg-Büchner-Schule,  
Gesamtschule / Gymnasialzweig, Rodgau  
1997 - 2000 Claus-von-Stauffenberg-Schule  
Gymnasiale Oberstufenschule, Rodgau  
2000 Abitur an der Claus-von-Stauffenberg-Schule

**Studium der Chemie:** 2000 - 2007 an der Technischen Universität Darmstadt

**Diplomarbeit:** Nov. 2006 - Jun. 2007, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Harald Kolmar, am Clemens-Schöpf-Institut für organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt.  
Titel: „Chemische Synthese membrangängiger Mikroproteine“

**Dissertation:** seit Juli 2007, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Harald Kolmar, am Clemens-Schöpf-Institut für organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt.  
Titel: „Neue Miniproteininhibitoren gegen die humane Typ II Transmembranserineprotease Matriptase (MT-SP1)“

Darmstadt, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Michael Tomaszowski